

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

**METÁN BELÉLEGZÉS HATÁSA AZ AKUT MESENTERIALIS ISCHAEMIA ÉS A KORAI
REPERFÚZIÓ OKOZTA BÉLSZAKASZ-FÜGGŐ FUNKCIONÁLIS, STRUKTURÁLIS ÉS
MOLEKULÁRIS VÁLTOZÁSOKRA PATKÁNY BÉLCSATORNÁBAN**

POLES MARIETTA ZITA

TÉMAVEZETŐK:

PROF. DR. FEKETE ÉVA
PROFESSZOR EMERITA

DR. BÓDI NIKOLETT
EGYETEMI ADJUNKTUS

DR. KASZAKI JÓZSEF
EGYETEMI DOCENS

BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA
SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI KAR
ÉLETTANI, SZERVEZETTANI ÉS IDEGTUDOMÁNYI TANSZÉK



SZEGED

2015

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK MAGYARÁZATA	4
1. BEVEZETÉS	6
1. 1. A bélcsatorna vérellátása.....	6
1. 2. A bélcsatorna ischaemia/reperfúziós károsodása	8
1. 3. A bélcsatorna motoros működése.....	10
1. 4. Ischaemia/reperfúzió okozta változások a bélcsatorna motoros funkcióiban.....	12
1. 5. A nitrerg neuronok szerepe a bélcsatorna ischaemia/reperfúziós károsodásában	14
1. 6. A bélfal oxidatív és nitrozatív stresszmarkereinek változása ischaemia/reperfúzió alatt.....	16
1. 6. 1. Xantin oxidoreduktáz aktivitás	16
1. 6. 2. Mieloperoxidáz aktivitás	18
1. 6. 3. A nitrogén-monoxid és metabolitjai	19
1. 7. Terápiás lehetőségek a mesenterialis ischaemia/reperfúziós sérülések kivédésére	21
2. CÉLKITŰZÉSEK	24
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	26
3. 1. Felhasznált állatok	26
3. 2. Kísérleti elrendezés	26
3. 3. A bélfal mioelektromos aktivitásának vizsgálata	29
3. 4. Immunhisztokémiai vizsgálatok	33
3. 4. 1. Minták előkészítése immunhisztokémiai vizsgálatokhoz.....	33
3. 4. 2. Immunhisztokémiai festések	33
3. 4. 3. Immunhisztokémiai festések kvantitatív analízise	34
3. 5. Oxidatív és nitrozatív stresszmarkerek szintjének vizsgálata.....	35
3. 5. 1. Minták előkészítése a szöveti xantin oxidoreduktáz és mieloperoxidáz enzimaktivitás, valamint a nitrit/nitrát szint meghatározására.....	35
3. 5. 1. 1. Szöveti xantin oxidoreduktáz enzimaktivitás mérés.....	36
3. 5. 1. 2. Szöveti mieloperoxidáz enzimaktivitás mérés	36
3. 5. 1. 3. Szöveti nitrit/nitrát szint meghatározás	37
3. 5. 2. Szöveti nitro tirozin szint meghatározás.....	38

3. 5. 3. A biokémiai minták fehérjetartalmának meghatározása.....	38
3. 5. 4. A biokémiai vizsgálatok eredményének statisztikai analízise.....	39
4. EREDMÉNYEK.....	40
4. 1. Általános megfigyelések	40
4. 2. A bélfal mioelektromos aktivitásának változása az ischaemia, az ischaemia/reperfúzió, valamint a kapcsolódó metán belélegzés hatására.....	40
4. 3. A nitrerg neuronok összneuronszámhoz viszonyított arányának változása az ischaemia, az ischaemia/reperfúzió, valamint a kapcsolódó metán belélegzés hatására	47
4. 4. Oxidatív és nitrozatív stresszmarkerek szintjének változása az ischaemia, az ischaemia/reperfúzió, valamint a kapcsolódó metán belélegzés hatására	49
4. 4. 1. Szöveti xantin oxidoreduktáz aktivitás változása	49
4. 4. 2. Szöveti mieloperoxidáz aktivitás változása	51
4. 4. 3. Szöveti nitrit/nitrát szint változása	53
4. 4. 4. Szöveti nitrotirozin szint változása.....	55
5. EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE	57
5. 1. A bélfal mioelektromos aktivitásának változása az ischaemia, az ischaemia/reperfúzió, valamint a kapcsolódó metán belélegzés hatására.....	57
5. 2. A nitrerg neuronok összneuronszámhoz viszonyított arányának változása az ischaemia, az ischaemia/reperfúzió, valamint a kapcsolódó metán belélegzés hatására	59
5. 3. Oxidatív és nitrozatív stresszmarkerek szintjének változása az ischaemia, az ischaemia/reperfúzió, valamint a kapcsolódó metán belélegzés hatására	62
5. 4. Az exogén metán, mint terápiás lehetőség a mesenterialis ischaemiás és ischaemia/reperfúziós sérülések kivédésére	65
5. 5. Következtetések.....	68
6. ÖSSZEFOGLALÁS	69
6. 1. Magyar nyelvű összefoglalás	69
6. 2. Summary	72
7. FELHASZNÁLT IRODALOM	75
8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	83
9. KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA	84

RÖVIDÍTÉSEK MAGYARÁZATA

AC	arteria coeliaca
AMI	arteria mesenterica inferior
AMS	arteria mesenterica superior
ANOVA	variancia analízis (analysis of variance)
ATP	adenozin-trifoszfát
AUC	görbe alatti terület (area under curve)
cGMP	ciklikus guanozin-monofoszfát
CH ₄	metán
DAB	3,3'-diaminobenzidin
DMSO	dimetil-szulfoxid (dimethyl sulfoxide)
DNS	dezoxiribonukleinsav
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav (ethylenediaminetetraacetic acid)
eNOS	endothelialis nitrogén-monoxid szintáz (endothelial nitric oxide synthase)
ENS	bélidegrendszer (enteric nervous system)
FAD	oxidált flavin-adenin-dinukleotid
FADH ₂	redukált flavin-adenin-dinukleotid
Fe/S	vas-kén csoport
H ₂ O ₂	hidrogén-peroxid
HEPES	N-2-hidroxietyl-piperazin-N'-2-etán-szulfonsav
HuC/HuD	humán neuronális fehérje
I/R	ischaemia/reperfúzió
IgG	immunglobulin G
iNOS	indukálható nitrogén-monoxid szintáz (inducible nitric oxide synthase)
IPAN	bélfal saját primer érző neuronja (intrinsic primary afferent neuron)
K ₂ HPO ₄	dikálium-hidrogén-foszfát
KH ₂ PO ₄	kálium-dihidrogén-foszfát
MMC	migráló mioelektromos komplex (migrating myoelectric complex)
Mo-co	molibdén kofaktor (molybdenum cofactor)
MP	myentericus plexus
MPO	mieloperoxidáz
mtsai.	munkatársai
Na ₂ EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav dinátrium sója
NAD ⁺	oxidált nikotinamid-adenin-dinukleotid
NADH	redukált nikotinamid-adenin-dinukleotid
NADPH	redukált nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát

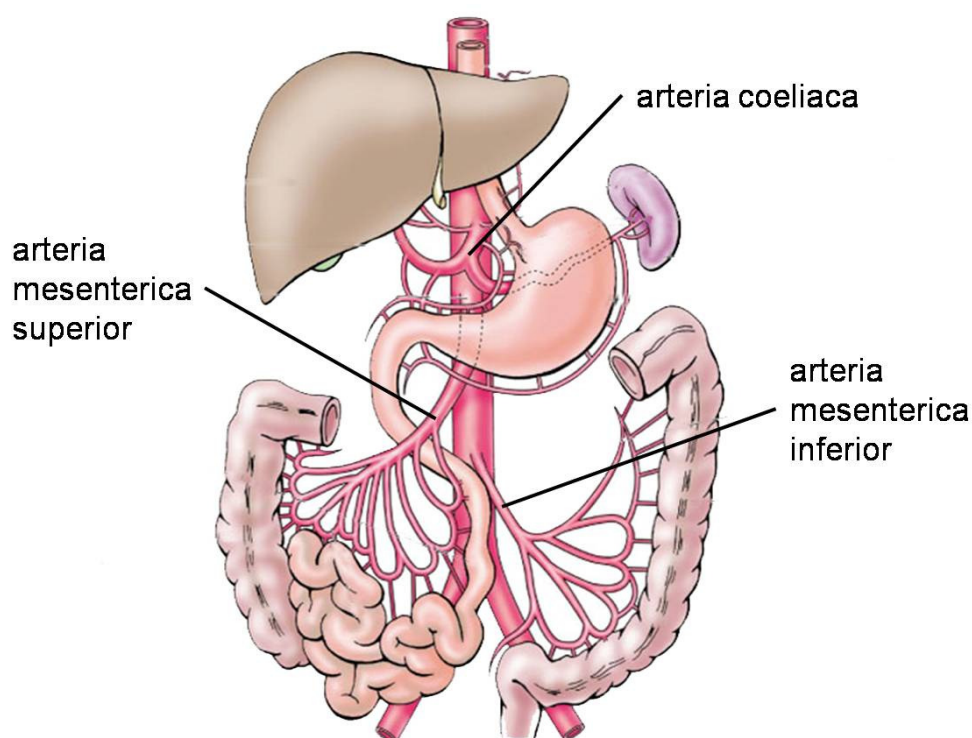
NaNO ₂	nátrium-nitrit
NaNO ₃	nátrium-nitrát
NaOH	nátrium-hidroxid
nNOS	neuronális nitrogén-monoxid szintáz (neuronal nitric oxide synthase)
NO	nitrogén-monoxid
NOS	nitrogén-monoxid szintáz (nitric oxide synthase)
O ₂ • ⁻	szuperoxid
ONOO ⁻	peroxinitrit anion
PB	foszfát puffer (phosphate buffer)
PBS	foszfát pufferes sóoldat (phosphate buffer saline)
PMSF	fenil-metil-szulfonil-fluorid (phenylmethanesulfonylfluoride)
PSD	bélspecifikus domináns frekvenciatartomány power spektrum denzitása (power spectrum density)
ROS	reaktív oxigén származékok (reactive oxygen species)
SEM	standard error of mean
SP	submucosus plexus
TMB	3,3'-5,5'-tetrametilbenzidin
TRIS	2-amino-2-hidroximetil-propán-1,3-diol
XDH	xantin dehidrogenáz
XO	xantin oxidáz
XOR	xantin oxidoreduktáz

Az idegen kifejezéseket az Orvosi Helyesírási Szótár (Akadémia Kiadó, Bp. 1992.) szabályainak megfelelően alkalmaztam, az ún. vagylagos írású címszavak esetén általában a magyaros írásmódnak megfelelően.

1. BEVEZETÉS

1. 1. A bélcsatorna vérellátása

Az emlős bélcsatorna vérellátását három nagy verőér, az *arteria coeliaca* (AC), az *arteria mesenterica superior* (AMS) és az *arteria mesenterica inferior* (AMI) biztosítja (1. ábra). Az AC a gyomor, az AMS a vékonybél és a colon proximális szakaszának, míg az AMI a vastagbél disztális szakaszainak vérellátásáért felel. E három artéria ellátási területe azonban nem különül el élesen egymástól. A mesenterium mentén számos anasztomózis kapcsolja össze a különböző arteriolákat és teremt kollaterális véráramlást. Az ellátó erek nagyfokú kollateralizációja miatt a vékonybél egyes szakaszai egy-egy ellátó ér kísérletes elszorításának következtében sem szenvednek teljes oxigénhiánytól (Premen és mtsai., 1987). A kísérletesen elszorított arteriolákhoz tartozó vékonybél szegmensek a kollaterális keringés segítségével a szomszédos szegmensektől 55%-ban képesek visszanyerni a vérellátásukat, miközben a szomszédos szegmensek vérellátása nem csökken jelentős mértékben (Bulkley és mtsai., 1985a).



1. ábra A humán bélcsatorna vérellátását biztosító erek sematikus rajza. Az *arteria coeliaca* a gyomor, az *arteria mesenterica superior* a vékonybél és a colon proximális szakaszának, míg az *arteria mesenterica inferior* a colon disztális szakaszainak vérellátását biztosítja. (Tank és Gest, 2008, Atlas of Anatomy alapján)

A bélcsatornát ellátó arteriolák a mesenterium *vasa recta* hálózatában folytatódnak, melyek behálózják a bélcsatorna teljes izomzatát, végül a submucosa rétegben artériás plexust alkotnak. Az innen kilépő arteriolák a nyálkahártyába, valamint a körkörös és hosszanti izomrétegekbe lépve párhuzamos lefutású kapilláris hálózatokra bomlanak. A bél falban keringő vér közel 20%-a a bél fal izomrétegein, 80%-a nyálkahártyán folyik keresztül (Chou és Grassmick, 1978). Az izmok kontrakciója elsősorban az izomrétegek, míg a bél fal feszülése inkább a nyálkahártya kapilláris hálózatának áramlását befolyásolja (Chou, 1982). A nyálkahártya kapilláris hálózata a bélcsatorna különböző szakaszain eltérő, az adott bélszakaszra jellemző felépítést mutat, így a vékony- és vastagbél mikrokeringési hálózatában jelentős különbségek vannak.

Emberben a vékonybél területén a nyálkahártyát ellátó arteriolák és a belőlük formálódó felszíni kapilláris hálózat lefutása a bélbolyhok (villusok) felépítéséhez igazodik. A vékonybélben a villusok keringését egy-egy, a bolyhok csúcsánál dús kapilláris hálózattal kapcsolódó, nem központi elhelyezkedésű arteriola és venula biztosítja (Fraser és Wayland, 1972). Ezzel szemben a vastagbélben az arteriolák a nyálkahártya mirigyei mellett futnak. A belőlük kialakuló felszíni kapilláris hálózat a vékonybélhez viszonyítva közelebb helyezkedik el az epithelium réteghez (Kvietys és mtsai., 1981). A hajszálerek a lumen felől nézve méhsejt alakú rajzolatot mutatnak, melynek denzitása a vastagbél proximo-disztális tengelye mentén csökken (Araki és mtsai., 1996). A mesenterialis ischaemia a vékonybélben sokkal nagyobb sérüléseket okoz, mint a gyomorban (Fukuyama és mtsai., 2001) vagy a vastagbélben (Takeyoshi és mtsai., 1996; Leung és mtsai., 1992). Ennek egyik oka lehet a bélcsatorna mikrokeringésének bélszakaszonként eltérő anatómiai felépítése. A vékonybél villusaiban még a bolyhok tövéénél az arteriolákból a venulákba diffundálhat az oxigén egy része, így a csúcsi részbe kevesebb oxigén jut (Jodal és Lundgren, 1986). A villusok csúcsának alacsonyabb szintű oxigenizáltsága abból is eredhet, hogy a csúcson elhelyezkedő epithelsejteknek magasabb a metabolikus aktivitása, mint az alap környéki epithelsejteké (Levitt és mtsai., 1980).

Az anatómiai eltérések mellett az átáramló vér mennyisége is bélszakaszonként változik. A vékonybélben, bár a pontos értékek fajonként eltérőek, nagyobb a percenként átfolyó vér mennyisége, mint a vastagbélben (Kvietys, 2010). Klemm és Moody (1998) különbségeket figyeltek meg a patkányok eltérő vékonybél szakaszainak és vastagbélének nyálkahártya-keringése között. Az egyes bélszakaszok anatómiai és véráramlásbeli különbségei miatt a bélcsatorna különböző szakaszai a keringési rendellenességekkel járó

patológiás elváltozásokra eltérő módon reagálnak (Klemm és Moody, 1998; Leung és mtsai., 1992).

Az egyes bélszakaszok vérellátása az emésztés aktuális fázisától függően tág határok között ingadozik. A gyomorban például nyugalmi állapotban a vér 20-25%-a található, mely étkezést követően mintegy 35%-ra emelkedik (Lanciault és Jacobson, 1976). Fiziológias körülmények között a vérellátás ilyen mértékű ingadozása ellenére a bélcsatorna oxigénellátottsága a külső humorális és neurális, valamint a belső szabályozó mechanizmusoknak köszönhetően egyenletes marad. A bélfal belső, saját kompenzációs működése miogén és metabolikus mechanizmusok útján valósul meg. A miogén mechanizmus az arteriolák tenziójának változására az érkeresztmetszet változtatásával reagál, s így biztosítja a kapillárisnyomás és a transzkapilláris folyadékcsere állandóságát (Sun és mtsai., 1992). A metabolikus mechanizmus az oxigénigény és oxigénellátottság közötti egyensúly eltolódásának hatására a bélcsatorna szöveteiben értágító hatású, vérbőséget okozó metabolitok keletkezését idézi elő (Granger és Nyhof, 1982). A kompenzációs mechanizmusok miatt a bélcsatorna a hosszabb idejű hipoperfúziót is jól tolerálja, látványos szöveti károsodások csak akkor jelennek meg, ha a vérellátás legalább 50%-kal csökken (Bulkley és mtsai., 1985b).

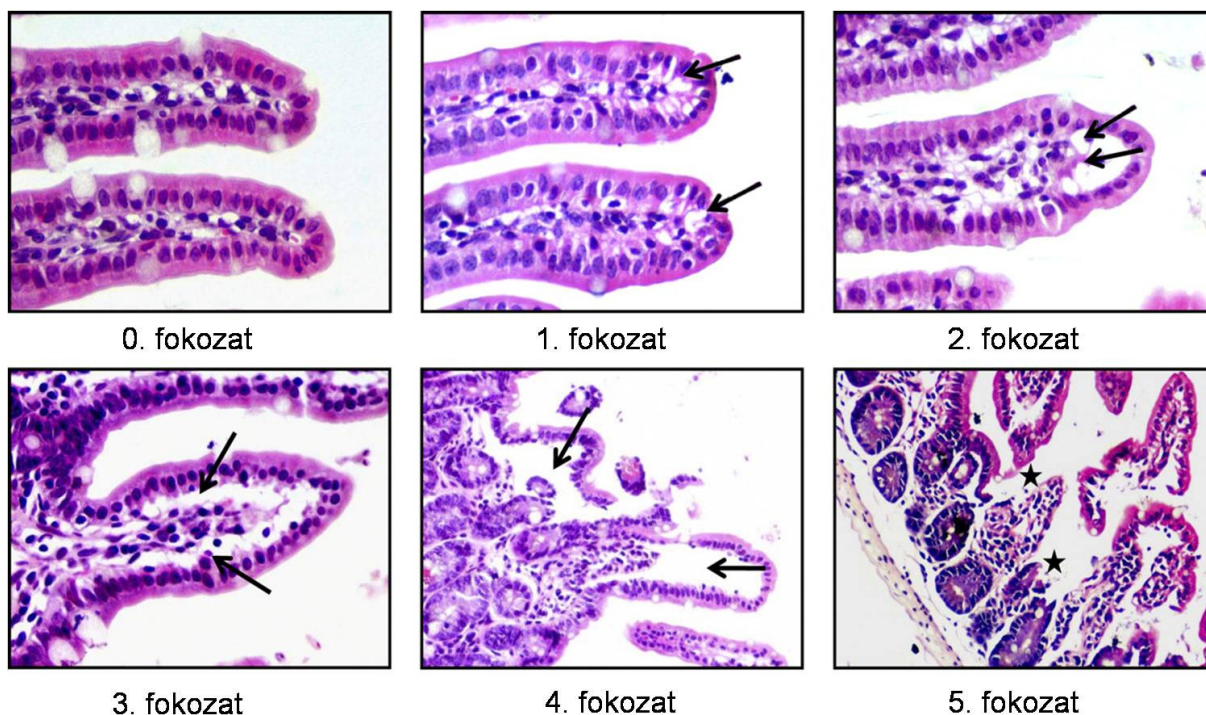
1. 2. A bélcsatorna ischaemia/reperfúziós károsodása

Az ischaemia egy szövet vagy szerv elégtelen vérellátását, s az ennek következtében fellépő oxigénhiányos állapotát jelenti. A bélcsatornát érintő ischaemiát az Amerikai Gasztroenterológiai Egyesület három főbb típusba sorolta. Ezek a mesenterialis erek elzáródása vagy elégtelen vérellátása következtében kialakuló akut mesenterialis ischaemia, a hosszabb ideig fennálló krónikus mesenterialis ischaemia, más néven bél angina, és a vastagbelet érintő ischaemiás colitis (Yasuhara, 2005).

A mesenterialis ischaemia a vékonybél átültetési műtétek vagy a nagyobb kardiovaszkuláris operációk gyakori velejárója. Kialakulása azonban nem csak az orvosi beavatkozások következménye lehet, kiváltó okai között szerepel például a súlyos vérvesztés, az alacsony vérnyomás, a szívelégtelenség, az embólia, az érelmeszesedés, a bélsavarodás vagy a mesenterialis erek vérrögös elzáródása. A mesenterialis ischaemia a bélcsatorna vérellátásának kompenzációs mechanizmusai miatt hosszú ideig tünetmentes vagy más betegségre is jellemző, nem specifikus tünetegyüttest mutat. Ezért maga az ischaemiás károsodás legtöbbször csak későn, a bélfal visszafordíthatatlan károsodása után ismerhető fel.

Ezzel magyarázható az, hogy a mesenterialis ischaemiával diagnosztizált esetek mortalitási rátája napjainkban is igen magas, 60-80% körül van.

A mesenterialis ischaemia szövettanilag észlelhető első jele a nyálkahártya károsodása. A szövettani metszetek értékelésére szolgáló, széles körben elterjedt skálát Chiu és munkatársai (1970) dolgozták ki. A nyálkahártya károsodásakor először a bélbolyhok csúcsán lévő epithelsejtek emelkednek el a villus felszínéről. Az ischaemia/reperfúziós (I/R) súlyosbodásával az epithelsejtek elemelkedése a villusok oldalára, végül a tövére is áttérjed. Az elemelkedést az epithelsejtek leválása követi, ami a bélbolyhok integritásának megszűnését eredményezi (2. ábra).



2. ábra Reprezentatív fénymikroszkópos felvételek paraffinba ágyazott, hematoxin-eozinnal festett egér vékonybél nyálkahártyájáról. Az egyes képek a nyálkahártya ischaemiás károsodásának fokozatait mutatják. 0. fokozat, a sértetlen nyálkahártya; 1. fokozat, a szubepithelialis Gruenhagen tér megjelenése, a villus csúcsának vakuolarizálódása (nyilak); 2. fokozat, az epithelium mérsékelt elemelkedése a lamina propria rétegtől (nyilak), a szubepithelialis tér növekedése; 3. fokozat, az epithelium nagy mértékű elemelkedése a lamina propria rétegtől (nyilak), az epithelium alatti vakuolák a bolyhok csúcsától a nyél közepéig érnek, 4. fokozat, az epithelium elemelkedése (nyilak) és a vakuolarizáció a villus alapjáig ér, 5. fokozat, a nyálkahártya fekélyesedése (csillagok), a lamina propria szétesése. (400x nagyítás) (Feinman és mtsai., 2010 nyomán).

Az ischaemiát követő reperfúzió során beáramló oxigén oxidatív stressz kialakulásához vezet, s ez tovább súlyosbíthatja az ischaemia okozta károsodásokat. Kísérletes körülmények között a 4 órán át tartó ischaemia, melyet nem követett reperfúzió, kisebb mértékű károsodást okozott, mint a 3 órás ischaemia, melyet 1 órás reperfúziós fázis

követett (Parks és Granger, 1986). A bélbolyhok epitheliuma azonban a keringés helyreállása után gyorsan regenerálódik. Kísérletes körülmények között, a sérülés mértékétől függően a villusok epitheliuma a 90 perces ischaemiát követő 6-18 óra után már alig különbözött a kontroll minták epitheliumától (Park és Haglund., 1992).

Az I/R-s károsodások mértékét a megelőző ischaemiás károsodások súlyossága szabja meg. Ezért az ischaemiához hasonlóan, az I/R is elsősorban a vékonybélben okoz jelentősebb patológiás elváltozásokat (Leung és mtsai., 1992). A reperfúzió késői fázisában kialakuló károsodások jól ismertek, mértékét az ischaemia és reperfúzió intenzitásának, valamint azok időtartamának függvényeként jellemzik (Haglund és mtsai., 1987; Blikslager és mtsai., 1997; Beuk és mtsai., 2008).

A bélcsatorna I/R-s károsodása mikrokeringési zavarok kialakulásához vezet. Ezek vagy a véráram hiányát (no-reflow) vagy annak csak részleges visszaállását (reflow paradox) jelentik a reperfúzió kezdetén (Vollmar és Menger, 2011). Az I/R során kialakuló mikrokeringési zavarok a nyálkahártya lamina epithelialis és a lamina propria rétegének további sérülését okozzák (Kvietys, 2010). I/R során a kapillárisok permeabilitása jelentősen megnő, a kiáramló plazmafehérjék helyi ödémát hoznak létre, s ez gyulladásos folyamatok kialakulásához vezet. A bélfal gyulladása során termelődő mediátor molekulák olyan szignalizációs folyamatokat indítanak el, melyek befolyásolják az entericus neuronok működését, s ez végül a bélcsatorna motoros funkcióinak zavarához vezet (Törnblom és mtsai., 2005). Arról azonban, hogy a már súlyos funkcionális zavarokat is okozó szövettani elváltozásokat megelőzően az ischaemia alatt, illetve a reperfúzió korai szakaszában milyen strukturális, funkcionális vagy molekuláris változások történnek a bélfalban, szinte semmit sem tudunk.

1. 3. A bélcsatorna motoros működése

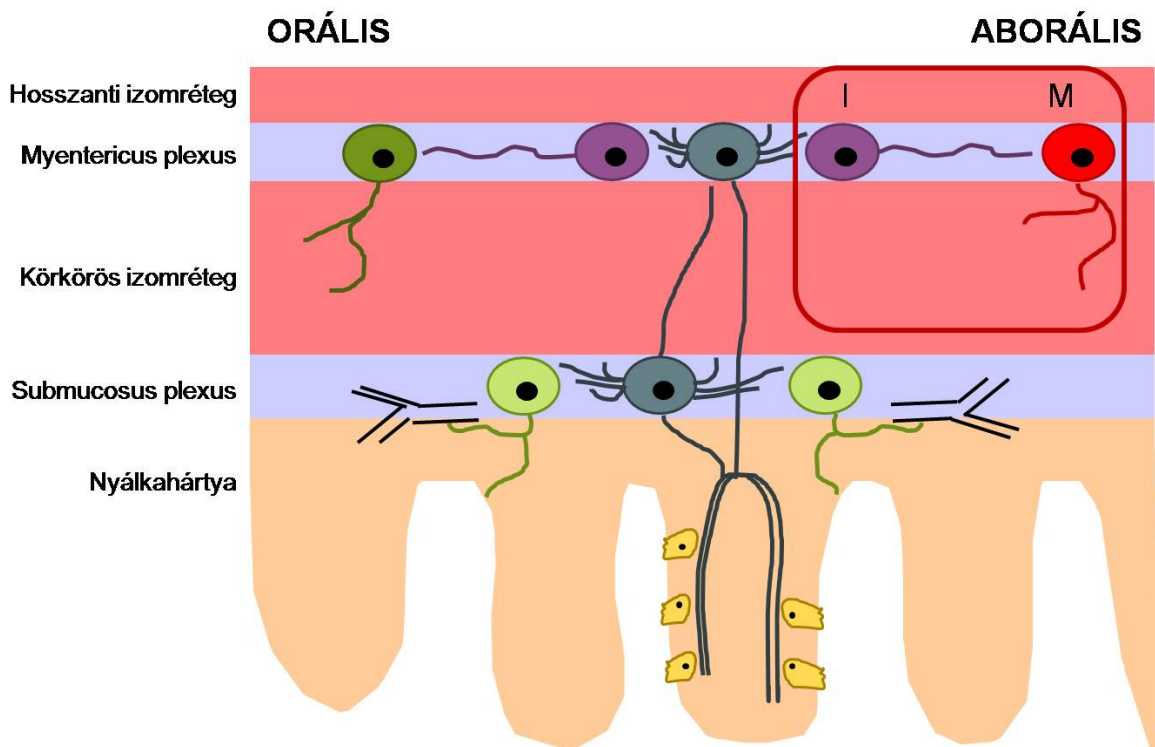
Fiziológias körülmények között a vékonybél öt különféle mozgásmintázatot mutat. Ezek a perisztaltikus, a migráló klaszter, a szegmentáló, az óriás aborális kontrakciók, valamint az étkezések közt jelentkező migráló mioelektromos komplex (migrating myoelectric complex, MMC) (Ehrlein és Schemann, 2004). A perisztaltikus hullámok felelősek a béltartalom (chymus) egyirányú, oro-anális transzportjáért. A lumenből érkező ingerek hatására az inger helyétől orálisan elhelyezkedő izmok kontrahálódnak, az attól aborálisan elhelyezkedő izmok pedig elernyednek. A kontrakciós hullámok kialakításában a bélfal körkörös és a hosszanti izomrétegei egyaránt meghatározó szerepűek. Nehéz ételek

fogyasztását követően migráló kontrakció csoportosulások (migrating clustered contractions) jelennek meg. Ez sok kis, egymást követő perisztaltikus hullámot jelent, melyek kis mértékben engedik a béltartalom orális irányba történő visszafolyását. A migráló kontrakció csoportosulások a béltartalmat lassan, rövid szakaszon továbbítják. A szegmentáló vagy más néven keverő mozgások, melyek jellemzően szintén nehéz ételek fogyasztását követően aktiválódnak, célja a béltartalom keverése és helyben tartása az emésztéshez szükséges ideig. A körkörös simaizmok rövid ideig tartó kontrakciói egymástól néhány centiméterre jelennek meg, a köztes szakaszok pedig elernyednek. Ezt követően a kontrakciós gyűrűk ellazulnak és az előzőleg ernyedt szakaszokon húzódnak össze. A MMC az étkezések közötti fázisokban jelentkezik, s perisztaltikus hullámok sorozataként vonul végig a bélcsatornán. Feladata a béltartalom ürítése. A bélcsatorna óriás kontrakciói hosszú ideig tartó, nagy amplitúdójú összehúzódnások eredményeként jelennek meg. Az óriás kontrakciók keletkezésük helyén teljesen elzárják a béllument, majd lassan aborális irányba vándorolnak, s így maguk előtt tolják a teljes béltartalmat. Az óriás kontrakciós hullámok rendszerint lassabban haladnak előre, mint a perisztaltikus hullámok.

Az emlős bélcsatorna egyes funkcióinak irányítását, a szekréció, az abszorpció és a motilitás összehangolását a bélidegrendszer (enteric nervous system, ENS) végzi (Bush, 2002). A ENS-t több kisebb, nem ganglionált és két nagyobb, ganglionált plexus építi fel (Meissner, 1857; Auerbach, 1864). A szekreto-motoros funkciók irányításáért felelős submucosus plexus (SP) a submucosa és a bélfal körkörös izomrétege között található. A motoros funkciók szabályozásában meghatározó szerepet játszó myentericus plexus (MP) a bélfal hosszanti és körkörös simaizomrétegei között húzódik. A ENS-t a központi idegrendszertől való nagyfokú függetlenség jellemzi. Benne, a perifériás idegrendszerben egyedülálló módon, mindhárom, az önálló reflexívek kialakításához szükséges funkcionális neurontípus jelen van (3. ábra).

A bélcsatorna motoros reflexeinek kiváltó ingereit (a bélfal feszülése, a béltartalom különféle kémiai anyagai) a bélfal saját primer érző neuronjai (intrinsic primary afferent neuron, IPAN) érzékelik, majd ezek a neuronok aktiválják a tőlük orális és aborális irányban található interneuronokat. A perisztaltikus reflex kialakításában fontos szerepet játszanak a MP felszálló serkentő, valamint a leszálló gátló izommotoneuronjai. A felszálló serkentő motoneuronok az inger helyétől orális irányban a bélfal kontrakcióját okozzák. A leszálló gátló motoneuronok ezzel szemben az aborális irányban megjelenő relaxációt váltják ki. A felszálló serkentő motoneuronok főbb serkentő hatású neurotranszmitterei a P anyag (substance P) és az acetilkolin. A leszálló gátló neuronok neurotranszmitterei közül

legjelentősebb szerepe a vazóaktív intesztinális polipeptidnek és a nitrogén-monoxidnak (NO) van (Furness, 2000). A neuronális eredetű NO előállításáért felelős NO szintáz (NOS) az egyes állatcsoportokban az entericus neuronoknak akár 50%-át is kitevő nitrerg neuronokban fejeződik ki (Van Geldre és mtsai., 2004).



3. ábra A bélfal saját reflexíveit kialakító neuroncsoportok sematikus rajza. A béllumenből érkező kémiai és mechanikai ingerek hatására a bélfal saját elsődleges érző neuronjai (IPAN, szürke sejtek) entericus reflexeket indítanak el. A IPAN-ok serkentő neurotranszmittereikkel aktiválhatnak más IPAN-okat, interneuronokat (lila sejtek), vagy közvetlenül motoneuronokat is (világoszöld, sötétzöld és piros sejtek). A perisztaltikus reflex megvalósításához a myentericus plexus IPAN-jai felszálló és leszálló interneuronokat is aktiválnak. A felszálló interneuronok felszálló serkentő motoneuronokat (sötétzöld sejtek) hoznak ingerületbe, ezzel az inger helyétől orális irányban kontrakciót váltanak ki. A leszálló interneuronok leszálló gátló motoneuronokat (piros sejtek) aktiválnak, s így az inger helyétől aborális irányban izomrelaxációt okoznak. A leszálló gátlás kialakításában fontos szerepet játszanak a NO-t neurotranszmitterként használó nitrerg neuronok. A piros kerettel a leszálló gátlás kialakításában részt vevő nitrerg neuronokat jelöltük. I – nitrerg interneuron, M – nitrerg izommotoneuron (Lomax és mtsai., 2006 nyomán)

1. 4. Ischaemia/reperfúzió okozta változások a bélcsatorna motoros funkcióiban

A nyálkahártyával ellentétben a bélcsatorna izomzata 2 órás hipoxiát követően sem mutat jelentős szövettani károsodásokat (Cassuto és mtsai., 1979), motoros aktivitását azonban a nem megfelelő oxigénellátás jelentősen befolyásolja. *In vitro* anoxiás körülmények között csökken a vastagbél lassú hullámainak frekvenciája és kontrakcióinak mértéke (Anuras és mtsai., 1980). Hasonlóan, *in vitro* anoxiás körülmények között, az oxigén és az energia 1

órás megvonása szignifikánsan csökkenti a jejunum kontraktilis aktivitását, a nyugalmi tenziót és a spontán kontrakciók számát (Bielefeldt és Conklin, 1997). Az *in vitro* kísérletek közös vonása, hogy a szervpreparátumokat 95% O₂-t és 5% szén-dioxidot tartalmazó gázkeverékkel tartják fiziológiás körülmények között, így az oxigén nitrogénre való teljes lecserélésével (95% nitrogén és 5% szén-dioxid) egyszerűen kiváltható a teljes anoxiás állapot. Ezzel szemben *in vivo* körülmények között az anoxia kiváltása a bélcsatornát ellátó erek nagyfokú kollateralizációja miatt csak több ellátó ér együttes elszorításával lehetséges. Az AMS és AMI együttes elszorítása azonban a kísérleti állatok 90-100%-os mortalitási rátájával jár (Beuk és mtsai., 2008). Az *in vivo* vizsgálatok során ezért a legtöbb esetben csak az egyik ellátó ér kísérletes elszorításának hatásait tanulmányozzák.

A bélcsatorna motoros aktivitását a nem teljes oxigénmegvonással járó hipoxia is jelentősen befolyásolja. Hebra és munkatársai (1993) a kontrakciók szignifikáns ciklusidő növekedését figyelték meg sertések vékonybelének 300 perces tamponáddal kiváltott hipoperfúziója alatt. A béltartalom továbbhaladási ideje ennek megfelelően szignifikánsan csökkent az álműtött állatokhoz képest. Udassin és munkatársai (1995) kísérleteikben kimutatták, hogy paradox módon az ischaemia kezdetén néhány percig fokozódik a patkányok bélcsatornájának motoros tevékenysége. Az AMS elszorítása, a trombinnal kiváltott trombózis vagy a belélegzett levegő oxigéntartalmának 75%-os csökkentése az ischaemia első 1-5 percében növelte a gyomorból és vékonybélből elvezetett tüske potenciálokat (spike) és fokozta az izomkontrakciót. Az ischaemia 15. perce után azonban a kontrakciók jelentősen csökkentek és a tüske potenciálok is teljesen eltűntek, a lassú hullámok azonban megmaradtak (Chou, 1982).

Azt, hogy a reoxigenizáció alatt a bélcsatorna motoros aktivitása képes-e visszatérni a fiziológiás állapotba, a megelőző hipoxiás állapot hossza határozza meg. 4 óránál hosszabb ischaemia esetén a lassú hullámok kivételével a motoros működések tartós zavara következik be. Ha azonban a keringés 1-3 órán belül helyreáll, a lassú hullámok, a tüske potenciálok és a bélcsatorna spontán kontrakciói a reperfúzió korai fázisában visszatérnek (Chou, 1982). A reperfúzió késői fázisában kialakuló bélmotilitási zavarokról számos irodalmi adat áll rendelkezésünkre. Patkányok ileumából illetve a jejunumából készített szervpreparátumok vizsgálatából tudjuk, hogy a 60-75 perces ischaemiát követő *in vitro* reperfúzió során a muszkarin agonista bethanecol vagy az acetilkolin okozta kontrakciók a reperfúzió 24. órájában jelentősen lecsökkennek (Hierholzer és mtsai., 1999; Ballabeni és mtsai., 2002). Akár az AMI, akár az AMS 45-60 perces kísérletes elszorítása jelentősen csökkenti a bélcsatorna tranzitidejét (Silva és mtsai., 2007; Calcina és mtsai., 2005).

A nitrerg neuronok szelektív gátlása a patkányok duodenumában csökkenti az AMS 1 órás elszorításának hatására bekövetkező kontrakciószám csökkenést (Takahashi és mtsai., 2001). A bélcsatorna motoros működésének szignifikáns megváltozása az ischaemia és a reperfúzió korai fázisa alatt, szignifikáns csökkenése a reperfúzió 24. órájában (Hierholzer és mtsai., 1999; Ballabeni és mtsai., 2002), valamint a tranzitidő szignifikáns emelkedése a reperfúzió késői fázisában (Calcina és mtsai., 2005; Silva és mtsai., 2007) egyértelműen a motoros működéseket szabályozó neuronok érintettségére utalnak.

1. 5. A nitrerg neuronok szerepe a bélcsatorna ischaemia/reperfúziós károsodásában

Az entericus neuronok 10 perces ischaemia és 2 órás *in vitro* szuperfúziós kezelés után megduzzadtak, mitokondriumaik és kromatinállományuk kis mértékben degradálódott. Az ischaemia idejének növelésével a neuronok strukturális károsodása fokozódott (Ventura-Martinez és mtsai., 2007). Az egy órás ischaemiát követő reperfúzió 24. órájában mind a SP, mind a MP-ban az acidofiliát mutató neuronok száma jelentősen megnőtt. 72 óra után megváltozott a myentericus neuronok morfológiája, majd egy héttel az ischaemiát követően a MP neuronjai pusztulni kezdtek (Lindeström és Ekbald, 2004). Calcina és munkatársai (2005) az 1 órás ischaemia, valamint az azt követő 24 órás reperfúziós fázis végén a patkányok ENS-ének neurokémiaileg azonosított neuroncsoportjait vizsgálták, s megállapították, hogy az I/R-s károsodásokra a neurokémiaileg különböző neuroncsoportok eltérő módon reagálnak. Az ileumban a vazoaktív intesztinális polipeptidet tartalmazó neuronok száma nőtt, míg a P anyagot tartalmazó neuronok száma csökkent. A calretinin-immunpozitív neuronok száma az 1 órás ischaemiát követő 1 vagy 7 nap reperfúzió során sem változott, míg a nitrerg neuronok száma jelentősen csökkent (Rivera és mtsai., 2009).

A NO keletkezését fiziológias körülmények között a NOS katalizálja. A NOS-nak három izoformája ismert, ezek a neuronális NOS (nNOS), az endothelialis NOS (eNOS) és az indukálható NOS (iNOS) (Bredt és mtsai., 1991). Az iNOS névvel ellentétben a másik két izoformához hasonlóan a bélben konstitutívan is expresszálódik, s patológias körülmények között mindhárom izoforma indukálható. A nNOS és eNOS Ca^{2+} -függő izoformák, míg az iNOS Ca^{2+} független, expresszióját gyulladásos mediátorok váltják ki. Bár a myentericus neuronokban mindhárom izoforma jelen van, a neuronális eredetű NO túlnyomó többségét a nNOS izoforma termeli (Vannucchi és mtsai., 2002). A különböző NOS izoformák a neuronok különböző subcelluláris kompartmentjeiben lokalizálódnak (Talapka és mtsai., 2011; Bódi és mtsai., 2014). A kompartmentalizációnak köszönhetően a környezeti feltételek

valószínűleg eltérő módon befolyásolják az egyes izoformák aktivitását, s így biztosítják a nitrerg neuronok nagyfokú plaszticitását, a különböző patológias körülményekhez való alkalmazkodását.

A NOS enzimek működése egy aktív és egy inaktív ciklussal írható le. Az aktív ciklus alatt L-argininből és oxigénből L-citrullin és NO keletkezik, miközben a NOS hem csoportja Fe^{2+} -ról Fe^{3+} -ra redukálódik. Az inaktív ciklus alatt a keletkező NO a hem csoporttal komplexet (Fe^{2+} -NO komplex) képez, mely oxigén hatására nitrát keletkezése mellett bomlik le. Az aktív ciklus alatt az oxigén hemhez kapcsolódása gátolja az enzim működését. Ezzel szemben az inaktív ciklus alatt az oxigén elengedhetetlen a Fe^{2+} -NO komplex felbomlásához (Dweik, 2005). A NO reaktív molekula, ennek következtében fél életideje rendkívül rövid. Gáz halmazállapota miatt a sejtmembránokon akadály nélkül átdiffundál, így a többi neurotranszmitterrel ellentétben nem tárolódik vezikulákban, szintézise és felszabadulása mindig igény szerint történik (Kasperek és mtsai., 2008). A NOS oxigén függése és az oxigénnek a NOS működésében betöltött szabályozó szerepe miatt a NO előállításához molekuláris oxigénre van szükség. Ezért hipoxiás állapotban a NO szintézise az oxigénhiány mértékétől függően zavart szenved.

Az oxigénhiány okozta mitokondriális károsodások jelentős mértékben megemelik a citoplazma Ca^{2+} szintjét (Dong és mtsai., 2006), mely a Ca^{2+} -függő eNOS és nNOS fokozottabb működése révén a reperfúzió kezdetén magasabb NO szintet eredményez (Rivera és mtsai., 2009). A reperfúzió késői fázisában tengerimalac ileumban a NOS-immunpozitív neuronoknak az összneuronszámhoz viszonyított aránya csökkent. A nitrerg neuronok szelektív pusztulása az AMS 1 órás elszorítását követő reperfúzió 24. órájában volt először mérhető, és a sejtpusztulás mértéke a reperfúzió 7. napjára tovább fokozódott (Rivera és mtsai., 2009).

A NOS működésének zavara hipoxiás körülmények között, fokozottabb aktivitása a reperfúzió kezdetén és a nitrerg neuronok szelektív pusztulása a reperfúzió késői fázisában azt mutatja, hogy a myentericus nitrerg neuronok érzékenyen reagálnak környezetük oxigenizáltsági állapotának változásaira. Arról azonban, hogy az ischaemiás inzultus során, illetve a reperfúzió korai fázisában változnak-e a nitrerg myentericus neuronok kvantitatív sajátságai, nem állnak rendelkezésünkre irodalmi adatok.

1. 6. A bélfal oxidatív és nitroztatív stresszmarkereinek változása ischaemia/reperfúzió alatt

Hipoperfúzió során a szöveti oxigénhiány súlyosan károsítja a mitokondriumokat. A hipoxia az elektrontranszport zavarát, ezáltal a reaktív oxigén származékok (reactive oxygen species, ROS) fokozott keletkezését okozza. ROS kis mennyiségben fiziológiás körülmények között is keletkeznek a mitokondriumban, és hírvivő molekulákként funkcionálnak a sejten belüli kommunikációs folyamatokban, nagy mennyiségben azonban sejtkárosító hatásúak (Finkel, 2003).

A reperfúzió során a szövetekbe áramló oxigén nagy mennyiségű ROS képződését okozza. A ROS által kiváltott lipidperoxidáció arachidonsav keletkezéséhez vezet. Az arachidonsav és származékai, az eikozanoidok elősegítik a fehérvérsejtek aktiválódását és vándorlását a sérült szövetekbe (Toyokuni, 1999). Az aktivált leukociták azután további, nagy mennyiségű ROS-at szabadítanak fel, s így fokozzák az oxidatív stresszt. A reperfúziós károsodások másik jelentős tényezője a nitroztatív stressz. A Ca^{2+} koncentráció növekedése fokozott NO felszabadulásához vezet. A NO maga is szabadgyök, párosítatlan elektronja miatt nagy affinitással lép reakcióba ROS-kal. Szuperoxiddal ($\text{O}_2^{\bullet-}$) való reakciója eredményeként peroxinitrit (ONOO^-) keletkezik, s ez nagy reakcióképessége miatt jelentős károsodásokat okoz a fehérjék szerkezetének megváltoztatásával (Grisham és mtsai., 1999).

1. 6. 1. Xantin oxidoreduktáz aktivitás

A xantin oxidoreduktáz (XOR) az I/R-s károsodások során keletkező ROS legjelentősebb forrása. Ugyanakkor anoxiás körülmények között nitrit és nitrát redukáló képessége miatt a NO termelésében is szerepet játszik (Cantu-Medellin és Kelley, 2013a). Mennyiségében az emlősök egyes szövettípusai között jelentős eltérések vannak. A legtöbb emlősállatban a májban és a bélcsatornában a legmagasabb a szintje (Harrison, 2002). A bélcsatorna egyes szakaszaiban jelentős bélszakasz-specifikus mennyiségi eltérések vannak. Macskákban a gyomor antrumának XOR szintje kétszer olyan magas, mint a corpusé (Perry és mtsai., 1986). Patkányok vékonybelének a XOR szintje megközelítőleg tízszer akkora koncentrációt mutat, mint a vastagbélé (Leung és mtsai., 1992).

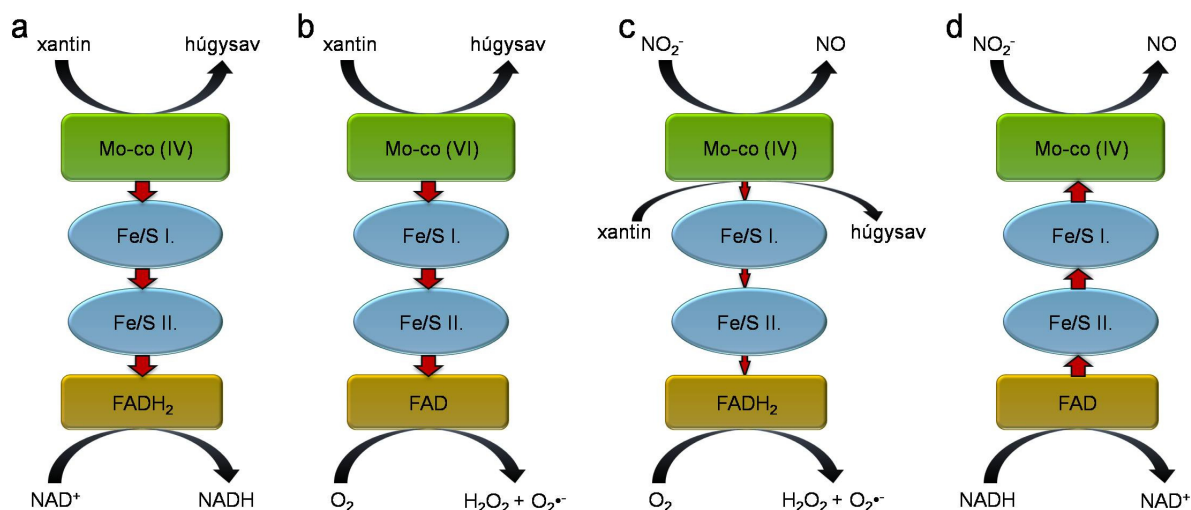
A XOR a sejtekben xantin dehidrogenáz (XDH) formában keletkezik, és fiziológiás körülmények között ebben a formában működik. Négy redoxi központja a molibdén kofaktor hely (molybdenum cofactor, Mo-co), a két vas-kén csoport és a flavin-adenin-dinukleotid

(FAD) hely. A XDH a purin degradáció utolsó két lépését katalizálja. Az enzim Mo-co helyén alakul a xantin hipoxantinná, illetve a hipoxantin hígysavvá. Az oxidáció következtében a szubsztrátokról származó elektronokat az enzim katalitikus helyei között a vas-kén csoportok vezetik. Az elektronok végül az enzim FAD helyén NAD^+ redukciójára fordítódnak (Cantu-Medellin és Kelley, 2013a) (4. ábra a). A XDH bizonyos körülmények között molekuláris oxigént is redukál, ilyenkor hidrogén-peroxid (H_2O_2) és $\text{O}_2^{\bullet-}$ keletkezik (4. ábra b). Például hipoxia esetén a mitokondriumok csökkent NADH oxidációjának következtében lecsökken a sejtek NAD^+ szintje, így a XDH elsősorban ROS-at termel (Harris és Massey, 1997).

Gyulladásos folyamatok, így az I/R során is, a XDH részleges proteolízis és/vagy fehérjeszerkezetének kritikus pontjain levő cisztein oldalláncainak módosulása következtében xantin oxidáz (XO) formává alakul át. Ellentétben a XDH formával, a XO jelentősen nagyobb affinitást mutat a molekuláris oxigén redukálására, így nagymértékben hozzájárul az I/R során keletkező ROS előállításához (Kuwabara és mtsai., 2003). Bár eleinte feltételezték, hogy a XO szinte kizárólag $\text{O}_2^{\bullet-}$ -ot állít elő, és a H_2O_2 ennek származéka, ma már tudjuk, hogy a fő termék a H_2O_2 (Kelley és mtsai., 2010). Mint minden enzim, így a XO működését is számos környezeti tényező, így a pH vagy a hőmérséklet, nagymértékben befolyásolja. A legmeghatározóbb tényező azonban a jelenlevő molekuláris oxigén mennyisége. Minél kisebb az oxigén tenzió, annál nagyobb arányban keletkezik H_2O_2 a $\text{O}_2^{\bullet-}$ rovására (Kelley és mtsai., 2010).

Anoxiás körülmények között, amikor az oxigénfüggő NOS működése gátolt, a XOR képes NO előállítására is (Millar és mtsai., 1998). A nitrát redukálása NO-dá az enzim Mo-co helyén megy végbe. A szükséges elektronok közvetlenül a xantin (4. ábra c) vagy közvetve a FAD helyen történő NADH oxidációjából származnak. Ez utóbbi esetben az elektronok retrográd módon, a FAD helyről a Mo-co helyre áramlanak (4. ábra d) (Cantu-Medellin és Kelley, 2013b). Ahogy a ROS előállítását, úgy a XOR NO termelését is számos tényező befolyásolja. A nitrit redukálásának egyik legfontosabb feltétele az alacsony oxigénkoncentráció. A túl magas koncentrációban jelen levő xantin a nitrit kötőhelyeinek blokkolásával szintén gátolhatja a NO keletkezését. Feltételezik azonban, hogy ischaemia alatt a nitrit redukálásához szükséges elektronok elsősorban a megemelkedett szintű NADH-tól származnak. A lecsökkent sejtben belüli pH ugyanis gátolja a xantin oxidálását (Cantu-Medellin és Kelley, 2013b). Az anoxiás körülmények között működő XOR által termelt NO nagy reakcióképességének köszönhetően könnyen elreagál a szintén a XOR által termelt $\text{O}_2^{\bullet-}$ -dal, ami peroxinitrit keletkezéséhez vezet. A XOR peroxinitrit termelése szintén

nagymértékben függ a jelenlevő oxigén koncentrációjától, ráadásul az enzim két formája eltérő affinitással katalizálja a reakciót (Harrison, 2002).



4. ábra A xantin oxidoreduktáz felépítése és az általa katalizált reakciók sematikus rajza. Az enzim négy redoxi központja a molibdén kofaktor hely (Mo-co), a két vas-kén csoport (Fe/S I. és II.) és a flavin-adenin-dinukleoid (FAD és FADH₂) hely. A xantin dehidrogenáz forma Mo-co helye a xantin hűgysavvá oxidálását katalizálja. A szubsztrátokról származó elektronokat a vas-kén csoportok vezetnek (piros nyilak) a FAD helyre, ahol NAD⁺ redukciójára fordítódnak (a). A xantin oxidáz, és bizonyos körülmények között a dehidrogenáz forma is, a xantin oxidációjából származó elektronokat hidrogén-peroxid (H₂O₂) és szuperoxid (O₂^{•-}) előállítására fordítja (b). Anoxiás körülmények között a xantin oxidoreduktáz képes a nitrit redukálására. A xantin oxidálódása a Mo-co helyen közvetlen elektronforrásként szolgál a szintén itt lejátszódó nitrit redukcióhoz. Ebben az esetben csökken a FAD hely felé történő elektronáramlás (vékony piros nyilak) (c). A nitrit redukciójához szükséges elektronok közvetve, a FAD helyen történő NADH oxidációjából is származhatnak. Ebben az esetben az elektronok retrográd módon, a FAD helyről a Mo-co helyre áramlanak (fordított piros nyilak) (d). (Cantu-Medellin és Kelley, 2013a nyomán)

1. 6. 2. Mieloperoxidáz aktivitás

A mesenterialis ischaemia okozta gyulladásos folyamatok során az érpályából kilépett leukociták proteázokat és elasztázokat szabadítanak fel, melyek az endothelialis glikokalix károsításával a mikroerek sérülését, mikrokeringési zavarokat okoznak. Ezek a folyamatok felelősek a reperfüzió korai fázisában kialakuló „véráram hiánya” és „véráram paradoxon” jelenségekért (Vollmar és Menger, 2011; Kaszaki és mtsai., 2013). Az aktivált leukociták kimutatásának egyik legelfogadottabb markere a belőlük felszabaduló mieloperoxidáz (MPO) aktivitásának meghatározása. A MPO az azurofil granulocitákban, a polimorfonukleáris neutrofil granulocitákban és a makrofágokban előforduló hemoprotein, proinflammatorikus enzim. Szerepe a gyulladásos folyamatok során szekretált erősen reaktív hipoklorid H₂O₂-ból történő előállítása. A MPO működése során keletkező hipoklorit H₂O₂-dal reagálva szinglet

oxigén keletkezéséhez vezet. A szinglet oxigén ugyan nem szabadgyök, de elektronszerkezete miatt a ROS-hoz hasonló tulajdonságokkal rendelkezik (Bhattacharyya és mtsai., 2014). Emellett a MPO az endothelialis eredetű NO eloxidálásával csökkenti annak biológiai hozzáférhetőségét, és aktívan részt vesz az erek gyulladásos folyamatokra adott válaszában (Eiserich és mtsai., 2002). Emelkedett aktivitása kimutatható a bélcsatorna gyulladással járó patológiás elváltozásainál, így az I/R okozta károsodások esetén is (Boros és mtsai., 2012).

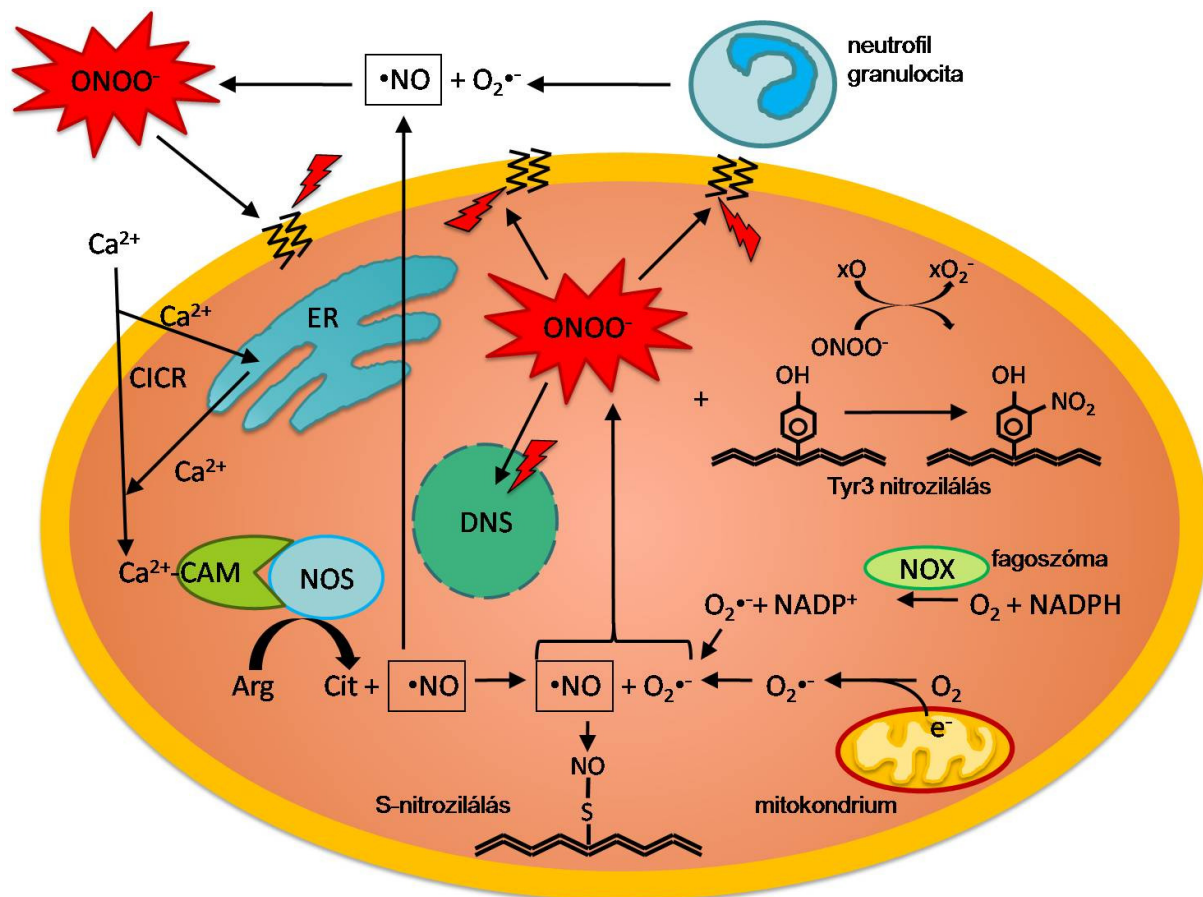
1. 6. 3. A nitrogén-monoxid és metabolitjai

A reperfúzió során a nitrerg neuronokban nagy mennyiségben keletkező NO maga is egy párosítatlan elektronnal rendelkező szabadgyök. Molekuláris oxigénnel vagy $O_2^{\bullet-}$ -dal való reakciója során reaktív nitrogéngyökök keletkeznek, melyek a ROS-kal együtt szerepet játszanak az I/R okozta oxidatív és nitrozatív stressz kialakításában. A dinitrogén-trioxid az egyik leggyakrabban keletkező reaktív nitrogéngyök, a fehérjék nitrozilálásával gyulladásos folyamatokat kiváltó citokinek keletkezését idézi elő (Grisham és mtsai., 1999). A másik leggyakoribb reaktív nitrogéngyök a peroxinitrit ($ONOO^-$), erős oxidálószer, oxidáló és nitroziláló hatása mellett degradálja a szénhidrátokat, lipidperoxidációt indukál és töréseket okoz a DNS-szálon (5. ábra). A tirozin csoportok nitrozilálásával megváltoztathatja a kinázok működését, ezáltal a jelátviteli útvonalakat is. Rivera és munkatársai (2011) 1 órás ischaemiát követően az entericus neuronok 10-15%-ában a nitrozilált proteinek átmeneti aggregációját írták le. A nitrozilált fehérjék 48 óra elteltével a legtöbb sejtből eltűntek, de az összes neuronból csak 7 nap elteltével tisztultak ki. A nitrerg neuronok NOS enzimeiben keletkező NO gyorsan elreagál a mitokondriumokban keletkező ROS-kal, így a $O_2^{\bullet-}$ -dal is, peroxinitrit keletkezése közben. Ezért a nitrerg neuronok különösen érzékenyek a fehérjék nitrozilálására és a nitrozatív stresszre.

Ugyanakkor, a NOS knock-out egerek vékonybele szignifikánsan nagyobb mértékben károsodott a 2 órás ischaemiát követő 3 és 24 órás reperfúzió során, mint a vad típusú egereké (Rivera és mtsai., 2012). Ez arra utal, hogy a NO szerepe kettős, az I/R-s károsodásokat súlyosbító, ugyanakkor azok ellen védő hatást is kifejtethet. Az adott fiziológiai vagy patológiai körülmények között a NO károsító vagy épp védő hatása az adott szövet NO tartalmától függ. A NO megnöveli a gyulladt szövetek véráramlását, a védő nyálka termelésének mennyiségét, csökkenti a leukociták kitapadását és véd a másodlagos fertőzésektől (Lundberg és Weitzberg, 2013). A NO emellett gyorsabban reagál el a $O_2^{\bullet-}$ -dal és más ROS-kal mint a dizmutázok, ami

a NO antioxidáns szerepére utal (Dweik, 2005). A hem csoport patológiás körülmények között ROS-kal reagálva erős és stabil oxidáló ágenst hoz létre, mely súlyos károsodásokat okozhat a sejtekben. A NO képes eredeti állapotukra redukálni a magasabb oxidáltsági állapotú hem csoportokat, és ezáltal megvédeni a sejteket az oxidatív stressztől (Wink és Mitchell, 1998). A hem tartalmú guanilil cikláz NO hatására a guanozin-trifoszfátot ciklikus guanozin-monofoszfáttá (cGMP) alakítja. A cGMP szabályozza többek között az értónust, gátolja a vérlemezkék aggregációját, az érfal-fehérvérsejt interakciókat (Grisham és mtsai., 1999). A lipidperoxidáció szintén az oxidatív stressz egyik meghatározó eleme. A folyamat során a többszörösen telítetlen zsírsavak maguk is szabadgyökökké válnak egy önmagát generáló láncreakció során. A NO a lipid-szabadgyökök reaktív csoportjához kötődve meggátolja a láncreakció továbbterjedését, megóvva ezzel a sejtet a további károsodásoktól (Rubbo és mtsai., 1994).

A NO rövid féléletideje miatt a szövetekből nehezen mutatható ki. A nitrit és a nitrát, a NO stabil oxidált származékai azonban jól használhatóak a NO markereként. Újabb kutatások kimutatták azt is, hogy a NO-hoz hasonlóan a nitrit és a nitrát a NO célezimeikhez kötve redukálódás közben NO-szerű hatást is képesek kiváltani. Fizikai aktivitás közben gátolják a vérlemezke aggregációt, csökkentik a vérnyomást és a szövetek oxigénfogyasztását (Lundberg és Weitzberg, 2013). A nitrit és nitrát a mitokondriumok citokróm c oxidázához kötve reverzibilisen gátolják a mitokondriális elektrontranszportlánc működését. A légzési lánc átmeneti gátlása csökkenti a keletkező ROS mennyiségét és elősegíti az oxigén diffúzióját a szövetek távolabbi részeibe anélkül, hogy az ATP termelést jelentősen csökkentené (Weitzberg és mtsai., 2010). Anoxia esetén, amikor az oxigénfüggő NOS működése gátolt, a nitrit és a nitrát a NO egyik forrása is lehet. A NO szint fenntartása érdekében a XOR, a mitokondriális légzési lánc elemei, vagy maga a NOS is képes a nitritet NO-dá redukálni (Weitzberg és mtsai., 2010; Lundberg és Weitzberg, 2013).



5. ábra Az ischaemia/reperfúzió alatt a nitrerg neuronokban kialakuló nitroatív stressz hátterében zajló biokémiai folyamatokat összefoglaló sematikus rajz. A neuronok membránja a stressz hatására depolarizálódik, s a feszültségfüggő Ca^{2+} -csatornákon át Ca^{2+} áramlik a citoplazmába. A citoplazma Ca^{2+} -szintjét az endoplazmatikus retikulumból (ER) érkező Ca^{2+} -függő Ca^{2+} felszabadulás (calcium induced calcium release, CICR) tovább növeli. A neuronális nitrogén-monoxid szintáz (nNOS) Ca^{2+} -calmodulin (CAM) függő enzim, a citoplazma emelkedett Ca^{2+} -szintje így közvetve fokozza a NO termelését. A keletkező NO nagy reakcióképességű molekula, gyorsan elreagál a reaktív oxigéngyökökkel, így a mitokondriumból vagy a fagoszó mákból felszabaduló szuperoxiddal ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peroxinitrit aniont (ONOO^-) képezve. A NO és a peroxinitrit reaktív molekulák, a NO a cisztein oldalláncokat nitrozilálja (S-nitrozilálás), míg a peroxinitrit a tirozin oldalláncokkal reagál (Tyr3 nitrozilálás). A poszttranszlációs módosítások a fehérjék térszerkezetének nem megfelelő kialakításához vezetnek. A peroxinitrit emellett töréseket okoz a DNS szálban és lipidperoxidáció révén a membránokat is károsítja. A NO gáz halmazállapotú, így képes átdiffundálni a plazmamembránon. A neutrofil granulocitákból és egyéb forrásokból érkező reaktív oxigéngyökökkel elreagálva peroxinitritet képez, mely a nitroatív stressz hatását a nitrerg neuronok környezetére is kiterjeszti. Arg: L-arginin, Cit: L-citrullin (Rivera és mtsai., 2011 nyomán)

1. 7. Terápiás lehetőségek a mesenterialis ischaemia/reperfúziós sérülések kivédésére

A bélcsatorna I/R okozta károsodásának kezelése máig megoldatlan kérdés. A terápiára irányuló kutatások több irányba mutatnak. Jól ismert az ischaemiás károsodások csökkentésének lehetősége prekondicionálás segítségével. Kimutatták, hogy ha az AMS

hosszú ideig tartó elszorítását többszöri rövid idejű elszorítás előzi meg, az ischaemia utáni mikrokeringési zavarok kisebb mértékűek lesznek. Javul a véráramlás, a leukociták kisebb mértékben tapadnak meg az érintett szövetekben, csökken az epithelium elvékonyodása, csökken a permeabilitás mértéke és ezáltal a baktériumok és egyéb káros anyagok véráramba jutása (Vollmar és Menger, 2011). A prekondicionálás mellett az ischaemiás posztkondicionálás védő hatása is jól ismert. Posztkondicionáláskor az ischaemiás elzáródás után, a reperfúzió első perceiben ismétlik meg az ér elzárását, ezzel csökkentve az oxidatív stressz mértékét (Liu és mtsai., 2009). A bélcsatorna I/R-s károsodásainak mértékét a béltartalom is befolyásolja. Az AMS 1 órás elszorítását megelőző éhezés például a reperfúzió első óráját követően szignifikánsan növelte a patkányok bélnyálkahártya kriptáiban az apoptotikus sejtek számát (Fujise és mtsai., 2006). Ezzel szemben szintén éheztetett, de az AMS elszorítása előtt szénhidráttartalmú vizet ivó patkányok vékonybelében a nyálkahártya gát funkciója jobban megmaradt, mint a sima vizet ivó állatok esetében (Bouritius és mtsai., 2008).

Napjainkban egyre nagyobb figyelem irányul az úgynevezett inert gázok (NO, szén-monoxid, kén-hidrogén, hidrogén, metán) inhalációján alapuló terápiás lehetőségekre (Moody és Calvert, 2011; Liu és mtsai., 2012). Az inert gázok lipidoldékony, endogén úton is keletkező hírvivő molekulák, melyek a sejtmembránokon szabadon átdiffundálnak, s így közvetlenül aktiválják az intracelluláris jelátviteli utakat. A NO, szén-monoxid és kén-hidrogén szöveteket védő szerepe myocardiális, máj és agyi I/R során jól ismert. Mindhárom gáz vazodilatációt okoz (Boehning és Snyder, 2003; Zhao és mtsai., 2001), az apoptotikus útgátlásával vagy antiapoptotikus fehérjék expressziójának fokozásával csökkentik az apoptotikus sejtek számát (Maejima és mtsai., 2005; Calvert és mtsai., 2009), befolyásolják a mitokondriális légzési folyamatot, elősegítik az antioxidáns molekulák keletkezését és gátolják a gyulladásos folyamatokat (Elrod és mtsai., 2007; Moody és Calvert, 2011).

Az elmúlt években végzett *in vitro* és *in vivo* vizsgálataink felvetették a metángáz eukarióta sejtekhez köthető, nem-bakteriális termelésének lehetőségét (Ghyczy és mtsai., 2008). Feltételezzük, hogy átmeneti oxigénhiányos állapotban az aerob anyagcserét folytató eukarióta sejtekben termelődő metán védelmet nyújthat a szervezet redoxi egyensúlyának felborulása ellen (Boros és mtsai., 2015). Újabb kutatások azt is igazolták, hogy a korábban biológiailag inaktívnak vélt színtelen, szagtalan metángáz belélegzése fiziológias körülmények között befolyásolja a bélcsatorna motoros aktivitását. A metán a bélcsatorna tranzitidejét csökkenti, ugyanakkor növeli a bélfal izomzatának kontrakció számát (Pimentel és mtsai., 2006; Jahng és mtsai., 2012). Néhány irodalmi adat utal arra, hogy a metán a többi

gázotranszmitterhez hasonlóan képes megvédeni a különböző szöveteket az oxidatív stressz okozta patológiás elváltozásoktól. A sejt-, majd az intracelluláris membránokon átdiffundálva szerepe lehet a magi DNS és a mitokondriumok védelmében (Liu és mtsai., 2012).

Az exogén metán gyulladáscsökkentő szerepét kutatócsoportunk I/R-s állatmodelleken vizsgálta. A reperfúziós fázis korai szakaszában alkalmazott metán belélegeztetés csökkentette a mikrokeringési zavarokat, a nyálkahártya károsodás mértékét és a vékonybél oxidatív és nitroztatív stresszmarkereinek szintjét. (Kaszaki és mtsai, 2013; Boros és mtsai, 2012). A metán védő hatásának pontos hatásmechanizmusa jelenleg nem ismert. A szerzők a jelenségre két lehetséges magyarázattal szolgálnak. Az egyik hipotézis szerint a metán befolyásolhatja a nitrogénciklust, s csökkentheti a NO és redukzív származékainak szintjét (Ettwig és mtsai., 2010), ezáltal mérsékelheti az I/R-t követő nitroztatív stresszt. A másik hipotézis szerint az apoláris metán rövid ideig képes felhalmozódni a sejtek membránjaiban, és így befolyásolni az integráns fehérjék (mint például a XOR) működését, ezáltal csökkenteni a ROS termelődését (Varga és mtsai., 2012).

Arról azonban, hogy a metán belélegzése befolyásolja-e az ischaemiás inzultus során és a reperfúzió korai fázisában a bélcsatornában kialakuló motoros zavarokat, valamint a strukturális és molekuláris változásokat, nem állnak rendelkezésünkre irodalmi adatok.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Az emlősök bélcsatornáját ellátó erek nagyfokú kollateralizációjának, valamint a bélfal vérellátásának kifinomult humorális és neuronális szabályozó mechanizmusainak köszönhetően az emésztőrendszer a hosszabb ischaemiás és reperfúziós periódusokat is jól tolerálja. Ezért a klinikai gyakorlatban a mesenterialis ischaemia legtöbbször csak akkor diagnosztizálható, amikor a hipoperfúzió vagy az azt követő reperfúzió következményeként kialakuló szöveti elváltozások már súlyos funkcionális zavarokat is okoznak, s a patológias folyamatok már visszafordíthatatlanok.

A hatékonyabb, korai diagnosztikai és terápiás lehetőségek kidolgozásának feltétele, hogy megismerjük azokat a strukturális, funkcionális és molekuláris eseményeket, amelyek magához az akut ischaemiához, illetve az azt követő korai reperfúzióhoz köthetők. Ezért mi munkánk során ezekre a periódusokra koncentráltunk, s egy olyan patkánymodellt használtunk, amely lehetővé tette, hogy külön vizsgáljuk magának az ischaemiának, és az ischaemiát követő korai reperfúzióknak a hatását a bélcsatorna mioelektromos aktivitására, a teljes myentericus neuronpopuláció, s ezen belül speciálisan a nitrerg myentericus neuronok kvantitatív sajátságaira, valamint az oxidatív és nitroztatív stresszmarkerek szintjére.

Tekintettel arra, hogy az egyes bélszakaszok vérellátásában nagyon alapvető anatómiai és funkcionális különbségek vannak, ahhoz, hogy a mesenterialis ischaemia, illetve a reperfúzió hatásának vizsgálata során nyert eredményeinkből általános érvényű következtetéseket vonhassunk le, a kísérleti állatcsoportok három, a vérellátás szempontjából nagyon különböző bélszakaszából, a duodenumból, az ileumból és a proximális colonból vett szövetmintákat vizsgáltuk.

Mivel kutatócsoportunk korábban már beszámolt arról, hogy normoxiás metánkeverék belélegzése csökkentette a mesenterialis I/R-t követő nyálkahártya gyulladás mértékét, a random módon felállított nyolc kísérletes állatcsoportban az ischaemiás és I/R-s csoportok mellett metánkezelt állatcsoportok is voltak. Az egyes kísérleti állatcsoportok vizsgálata során nyert eredményeket a csoportnak megfelelő álműtött állatok vizsgálati eredményeivel hasonlítottuk össze, s a következő kérdésekre kerestük a választ:

Vannak-e bélszakasz-specifikus különbségek az akut ischaemia, illetve az ischaemiát követő rövid reperfúziós fázisban:

- a bélfalizomzat kontrakcióinak frekvencia- és amplitúdó értékeiben?

- a teljes myentericus neuronpopuláció, illetve a myentericus nitrerg neuronok kvantitatív sajátásaiban?
- a szöveti oxidatív és nitrozatív stresszmarkerek szintjében?

Ha vannak ilyen különbségek, akkor az ischaemiás fázis végén és a reperfúziós fázis elején alkalmazott metán belélegzés befolyásolja-e ezeket?

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

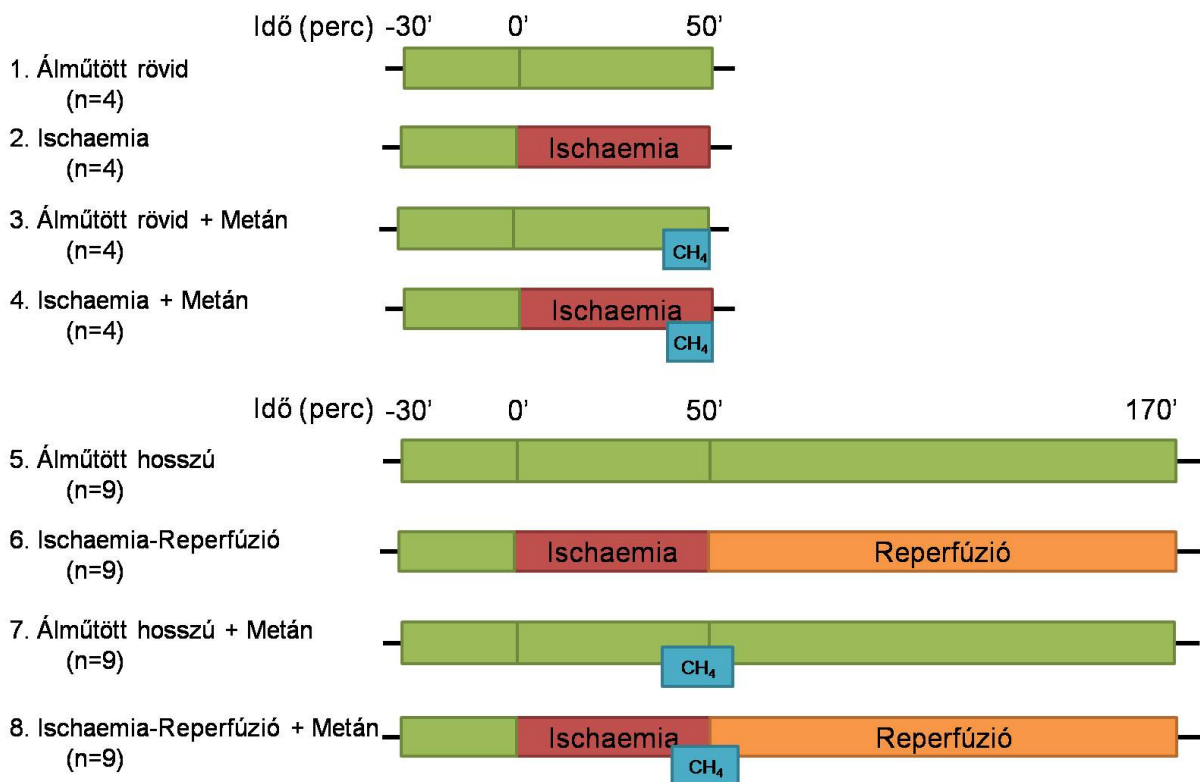
3. 1. Felhasznált állatok

Munkánk során egészséges, felnőtt, hím, 300-350 g-os Sprague Dawley patkányokat használtunk. A kísérleti állatok tartása és felhasználása az Európai Unió (2010/63/EU), valamint a magyar törvényi szabályozásnak (XXVIII/1998, 243/1998) és a Kormány rendeletének (40/2013 II. 14.) megfelelően, a Szegedi Tudományegyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottságának hozzájárulásával, a Megyei Élelmiszerlánc-Biztonsági és Állategészségügyi Igazgatóság engedélyével (engedélyszám: V./148/2013, érvényes 2017. december 31.) történt.

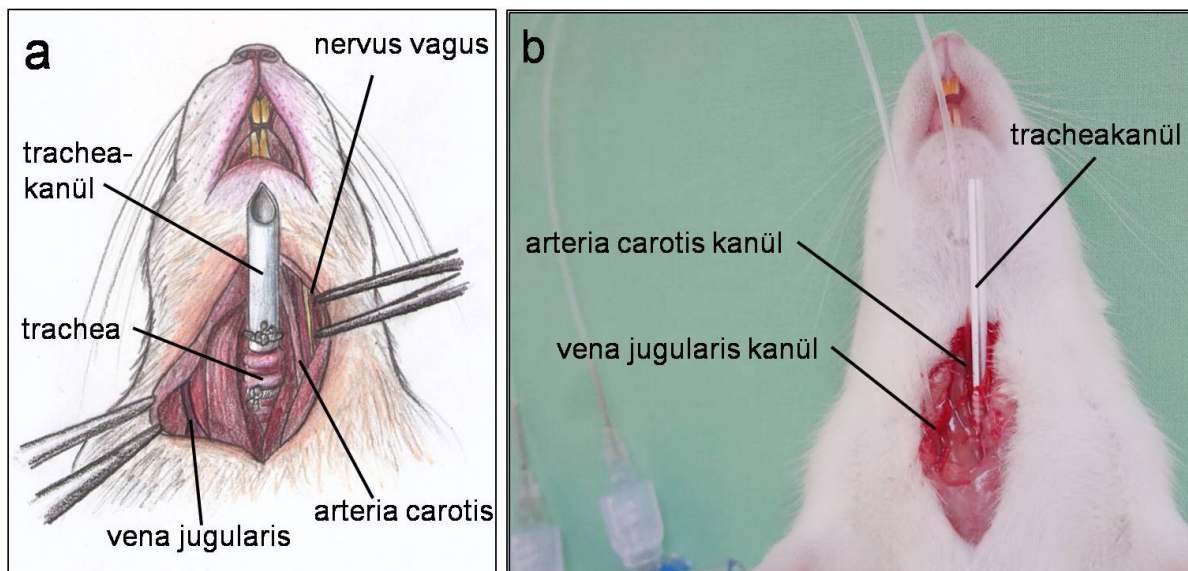
Kísérleteinkben magának az ischaemiának, valamint az azt követő reperfúzióknak a hatását vizsgáltuk a bélcsatorna mioelektromos aktivitására, a myentericus neuronok kvantitatív sajátosságaira, valamint az oxidatív és nitroztatív stresszmarkerek szintjére. Az állatokat a kísérletsorozathoz random módon négy rövid (mintavétel közvetlenül az 50 perces ischaemiás fázis után) (6. ábra 1-4. állatcsoportok), illetve négy hosszú (mintavétel az ischaemiát követő 120 perc reperfúziós fázis után) (6. ábra 5-8. állatcsoportok) vizsgálati idejű állatcsoportra osztottuk. Az 5-8. állatcsoportokban a hipoxia és reoxigenizáció során a bélfalba rögzített elektro-miográfiás szenzorok segítségével folyamatosan regisztráltuk a bélcsatorna mioelektromos aktivitását. Az alapaktivitás meghatározásához az ischaemia kiváltása előtt 30 perccel kezdtük el a regisztrációt. Az 1-4. állatcsoportokból mioelektromos aktivitást nem vezettünk el, de az állatcsoportok összehasonlíthatóságának érdekében az ischaemia kiváltását minden esetben 30 perces nyugalmi szakasz előzte meg.

3. 2. Kísérleti elrendezés

A kísérleti állatokat intraperitonealisan adagolt ketamin (45,7 mg/kg) és xylazin (9,14 mg/kg) keverékével altattuk el. Az állatok a kísérlet teljes ideje alatt altatásban voltak, melyet szintén intraperitonealisan, alacsonyabb dózisban adagolt ketamin (22,8 mg/kg) és xylazin (4,5 mg/kg) keverékével tartottunk fenn. Tracheosztómia után kipreparáltuk a *vena jugularist* és az *arteria carotist*, majd az erekbe kanült vezettünk (7. ábra). Ezt követően megmértük az állatok artériás középnyomását (SPEL Advanced Cardiosys 1.4; Experimetria Kft., Magyarország). Az állatok folyadékvesztését a kísérlet ideje alatt fiziológiás sóoldat infúzióval pótoltuk.



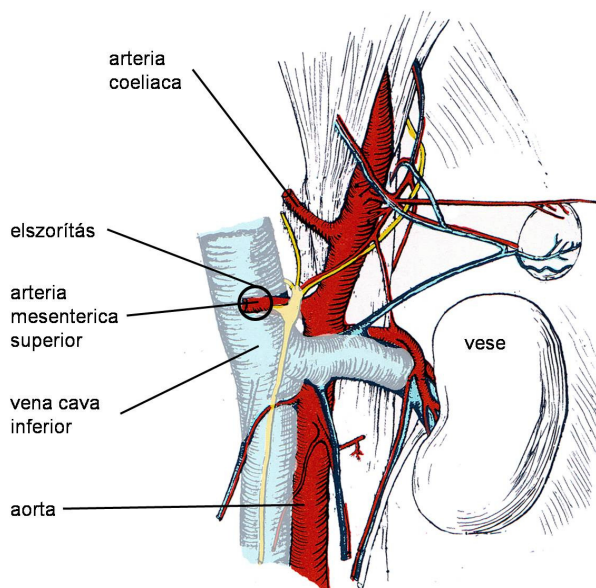
6. ábra Kísérleti állatcsoportok az ischaemiának, az ischaemia/reperfúciónak, valamint az ischaemiás fázis utolsó 10 és a reperfúziós periódus első 5 percében alkalmazott metán belélegezésnek a bélcsatorna mioelektromos aktivitására, a myentericus neuronok kvantitatív sajátosságaira, valamint az oxidatív és nitroztatív stresszmarkerek szintjére gyakorolt hatásainak vizsgálatához. Zöld színnel a kísérlet beavatkozás nélküli időszakait jelöltük, a piros szakaszok az ischaemiás, míg a narancssárgák a reperfúziós fázisokat mutatják. Kékkel a metánkeverék belélegeztetésének idejét tüntettük fel.



7. ábra Az állatok előkészítése a vizsgálatokhoz. A tracheakanül, az arteria carotis és a vena jugularis elhelyezkedése a sematikus rajzon (a) és a kanülok elhelyezkedése kísérleti állatban (b).

A hasi bőr felmetszését követően steril medián laparotómiát végeztünk, majd a bélcsatorna megemelésével szabaddá tettük és kipreparáltuk az AMS-t. A bélcsatornát ezután visszahelyeztük a hasüregbe, majd a műtéti stressz csökkentése érdekében az állatokat 30 percig pihentettük, s vizsgálatainkat ezt követően kezdtük meg. Az ischaemia kiváltását minden vizsgált állatcsoport esetében egy újabb 30 perces nyugalmi periódus előzte meg (6. ábra -30' és 0' között). Az 5-8. állatcsoportokban ekkor regisztráltuk az alapaktivitás mioelektromos jeleit.

Az ischaemia kiváltásához (6. ábra 0') a 2., 4., 6. és 8. állatcsoportokban az AMS-t az aortából való eredésétől fél cm-re disztálisan, mikro érfogó csipesz segítségével elszorítottuk (8. ábra). Az 1., 3., 5. és 7. álműtött állatcsoportokban nem váltottunk ki ischaemiát, azok a nekik megfelelő ischaemiás és I/R-s állatcsoportok kontrolljaként szolgáltak. A 3., 4., 7. és 8. állatcsoportokban az ischaemiás fázis utolsó tíz percében az állatok 2,2 térfogatszázalék metánnal dúsított normoxiás levegőkeveréket (Linde Gas, Magyarország) lélegezttek be. A 7. és 8. állatcsoportokban a normoxiás metánkeverék belélegeztetése a reperfúziós fázis első öt percében is folytatódott.



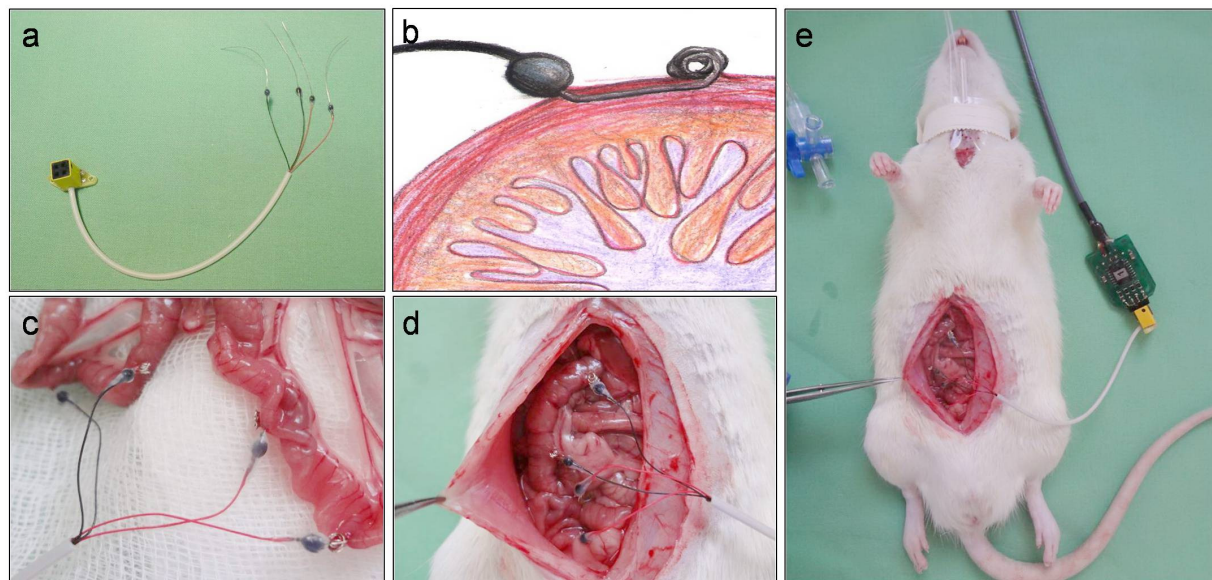
8. ábra Az arteria mesenterica superior (AMS) eredési helyének sematikus rajza patkányban (Greene, 1955, Anatomy of the rat alapján). A bekarikázott rész jelöli az AMS-nak az aortából való eredésétől fél centiméterre disztálisan levő részét, ahol az eret az ischaemia kiváltásához mikro érfogó csipesz segítségével elszorítottuk.

A mintavétel előtt minden állatcsoportban megmértük az artériás középnyomást, majd automata vérgáz analizáló műszer (Cobas b121; Roche, Ausztria) segítségével meghatároztuk az artériás vér vérgáz szintjét. Ezt követően az állatok duodenumából, ileumából és colonjából immunhisztokémiai és biokémiai vizsgálatokhoz szövetmintákat vettünk. Az 1-4.

állatcsoportokból közvetlenül az 50 perces ischaemiás fázis után (6. ábra 50') vettünk mintát, s ehhez a 2. és 4. állatcsoportokban nem engedték fel az AMS-t. A 6. és 8. állatcsoportokban az AMS-t 50 perc után felengedtük (6. ábra 50'), majd az 5-8. állatcsoportokból a 120 perces reperfúziós fázis végén (6. ábra 170') vettünk mintákat. A mintavételt követően az állatokat intraperitonealisan adagolt ketamin (67,5 mg/kg) és xylazin (13,5 mg/kg) keverékkel túlaltattuk.

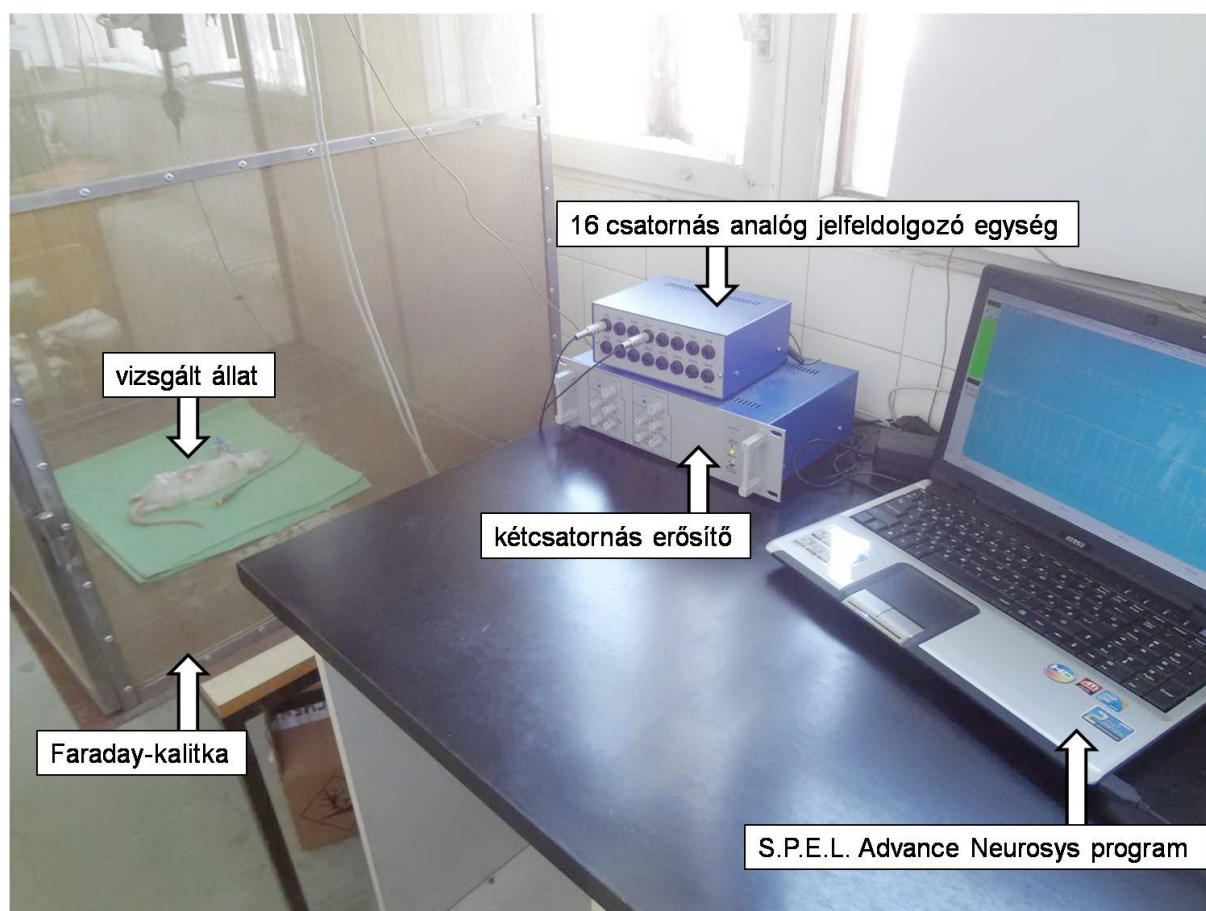
3. 3. A bélfal mioelektromos aktivitásának vizsgálata

Az elektro-miográfiás vizsgálatokhoz az 5-8. állatcsoportokat használtuk. Az állatok ileumának falába Ag/AgCl elektro-miográfiás szenzorokat (Experimetria Kft., Magyarország) rögzítettünk (9. ábra a). A szenzorokat a bélfal külső izomrétegén vezettük át, figyelve arra, hogy ne érintkezzenek a béllumennel vagy annak tartalmával (9. ábra b). Ehhez a hasüregből kiemeltük a coecumot és az ileum aborális szakaszát, majd a két szenzorpárt a coecumtól orálisan két-két ponton rögzítettük. Az első szenzorpárt a coecumtól 10 cm-re rögzítettük, a másodikat az első pártól orálisan, attól 5 cm-re. A szenzorpárok között 1-2 cm helyet hagytunk (9. ábra c). Az elektródák túlnyúló szálait csipesz segítségével feltekertük, hogy ne sértsék fel az állat belét, majd a bélszakaszokat óvatosan visszahelyeztük a hasüregbe (9. ábra d, e). A műtéti stressz csökkentése érdekében az elektro-miográfiás jelek detektálásának megkezdése előtt az állatokat 30 percig pihentettük.



9. ábra Az elektro-miográfiás szenzorok rögzítése a bélfalba. Kétcsatornás Ag/AgCl bélfalba varrható elektro-miográfiás szenzor (a). A szenzorok helyzete a bélkeresztmetszet sematikus rajzán (b) és a kísérleti állat ileumán (c). A bélfalba rögzített szenzorok elhelyezkedése a hasüregben (d). Elektro-miográfiás mérésre előkészített állat, a szenzor az elektro-miográfiás műszerhez csatlakozik (e).

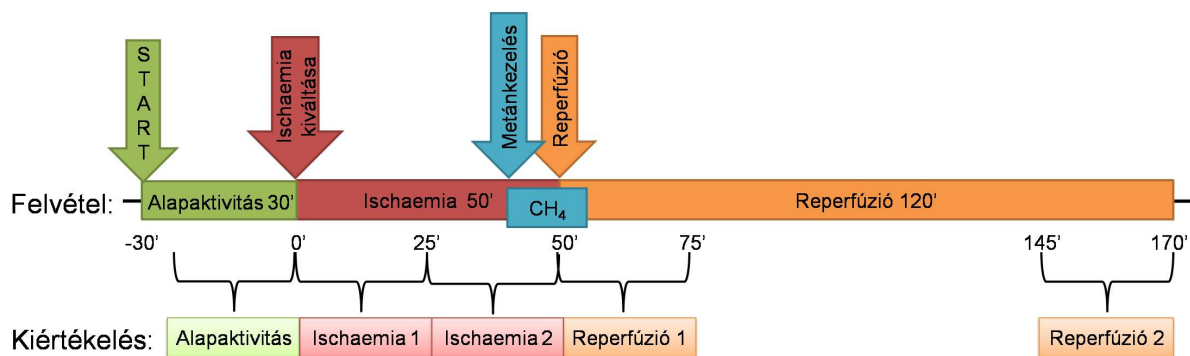
Az állatok bélfalának mioelektromos jeleit AMP-04 típusú két csatornás szélessávú előerősítőt is tartalmazó erősítő (Experimetria Kft., Magyarország), valamint a SOFT-08-02-USB típusú, NiDAQ kártyával rendelkező 16 csatornás analóg jelfeldolgozó egység (Experimetria Kft., Magyarország) segítségével vezettük el. Az állatokat a környezetből érkező elektromos zaj kiszűréséhez Faraday-kalitkába fektettük, a bélfalukba rögzített szenzort az erősítőhöz csatlakoztattuk (10. ábra), majd megkezdtuk az elektro-miográfiás jelek felvételét. A 0,01 és 0,99 Hz közé eső frekvenciatartományban felvett adatokat S.P.E.L. Advance Neurosys EEG programmal (Experimetria Kft., Magyarország) rögzítettük. A felvételek 30 percig tartó alapaktivitás regisztrációjával indultak, melyet az ischaemia alatti 50 perces, majd a reperfúzió alatti 120 perces regisztrátumok felvételei követtek.



10. ábra Elektro-miográfiás mérési elrendezés. A kísérleti állatokat Faraday-kalitkába fektettük, az ileumukba rögzített Ag/AgCl szenzort a két csatornás szélessávú erősítőhöz csatlakoztattuk. A jel az analóg jelfeldolgozó egység USB kimenetén át került a számítógépbe. Az adatokat S.P.E.L. Advance Neurosys EEG programmal rögzítettük és analizáltuk.

Előzetes kísérleteink alapján a felvételek megbízható kiértékeléséhez legalább 20-25 percig tartó folyamatos regisztrátumra van szükség. A felvételt ezért öt 25 perces időintervallumban analizáltuk. Az *Alapaktivitás* az ischaemia kiváltását közvetlenül megelőző

25 perc kiértékelése. Az 50 percig tartó ischaemiát az ischaemia ideje alatt változó mioelektromos aktivitás pontosabb nyomonkövetése érdekében két részre osztottuk (*Ischaemia 1* és *Ischaemia 2*). A reperfúzió 120 percéből szintén két 25 perces időintervallumot emeltünk ki. A reperfúzió kiváltása után mért első 25 perc kiértékeléséből a *Reperfúzió 1*, a reperfúziós szakasz utolsó 25 percének kiértékeléséből a *Reperfúzió 2* értékek származnak (11. ábra).



11. ábra Kísérleti protokoll a bélfal mioelektromos jeleinek elvezetéséről, kiértékeléséről. Az időtengelyen az elektro-miográfiás regisztrátum különböző fázisait tüntettük fel. A felvétel öt időintervallumát 25-25 perces regisztrátumokon értékeltük ki.

A mioelektromos jelek kiértékeléséhez a felvett regisztrátumból először kiszűrtük a zajnak tekinthető jeleket. Irodalmi adatok szerint a tápcsatorna egyes szakaszainak (gyomor, vékony- és vastagbél) jelei eltérő frekvenciához köthetők (Alvarez és Mahoney, 1922; Bass és mtsai., 1961; Couturier és mtsai., 1969). Ezek alapján a vékonybél jeleit 0,16 – 0,23 Hz, a vastagbélét 0,11 – 0,15 Hz frekvenciatartományra szűrt jelekből vizsgáltuk. A megszűrt regisztrátum azokat a bélfalból érkező mioelektromos jeleket tartalmazza, melyek a vizsgált bélszakasz simaizomzatának kontrakcióit váltják ki. A bélcsatorna motoros tevékenysége annak két jellemző tulajdonságával, a kontrakciók frekvenciájával, valamint azok erősségével, azaz amplitúdójával jellemezhetőek. A felvett, időben változó jelek a kísérleti állatokból érkező különböző frekvenciájú, amplitúdójú és fázisú jelek összegeként értelmezhetőek. A regisztrátumok gyors Fourier-transzformációjával meghatározható az ezeket a jeleket alkotó szinusz alapkomponeensek frekvenciája és amplitúdója. Kísérleteinkben a gyors Fourier-transzformációt követően meghatároztuk a különböző bélszakaszoknak az adott időintervallumban jellemző domináns frekvenciáját, és az ehhez tartozó power spektrum denzitását (power spectrum density, PSD) (Chen és McCallum, 1994) (12. ábra). Ez utóbbi érték a domináns frekvenciához tartozó amplitúdó, a bélcsatorna motoros aktivitásának a kontrakciók nagyságára vonatkozó komponensét jellemzi. A PSD a domináns frekvenciához hasonlóan absztrakt érték, hozzá közvetlenül fiziológiai jelenség nem tartozik.

A mioelektromos jelek statisztikai analízisét a SigmaStat for Windows (Jandel Scientific, Németország) szoftver segítségével végeztük el. Az egyes állatcsoportokon belül az alapaktivitástól való időben változó eltérés megállapításához, valamint a vizsgált állatcsoportok közötti különbségek kimutatásához két szempontos variancia analízist (analysis of variance, ANOVA) alkalmaztunk, a páronkénti összehasonlítás Holm-Sidac post-hoc teszttel történt. A szignifikancia szintjét $p < 0,05$ valószínűségi értékben határoztuk meg. Az adatokat átlag \pm SEM (standard error of mean) formában tüntettük fel.



12. ábra Az elektro-miográfias felvételek kiértékelése. A kísérleti állatokból elvezetett mioelektromos regisztrátumok képe (a). Az adatok gyors Fourier-transzformációját követően a grafikonról (b) és a hozzá tartozó táblázatból (c) leolvashatóvá válik a bélspecifikus domináns frekvenciatartomány és a hozzá tartozó power spektrum denzitás (PSD) értéke.

3. 4. Immunhisztokémiai vizsgálatok

3. 4. 1. Minták előkészítése immunhisztokémiai vizsgálatokhoz

Immunhisztokémiai vizsgálatainkhoz a duodenumból, az ileumból és a colonból 7-7 cm-es mintákat vettünk. A duodenális minták orális végét a pylorustól 1 cm-re disztálisan, az ileális minták aborális végét az ileo-coecalis junctiótól 1 cm-re proximálisan, a colonból vett minták orális végét pedig attól 1 cm-re disztálisan határoztuk meg. A kiboncolt bélszakaszokat foszfát pufferben (phosphate buffer, PB; 0,05 M; pH=7,4) alaposan átmostuk, a mesenterium mentén felvágtuk, kiterítettük, majd 4%-os paraformaldehid-oldatban (az oldat 0,1 M-os PBS-el készült; pH=7,4) 4 °C-on kifeszítve egy éjszakán át fixáltuk. A bélnyúzat preparátumok elkészítéséhez a mintákról sztereomikroszkóp alatt eltávolítottuk a nyálkahártyát és a submucosa réteget, majd csipesz segítségével lehúztuk a körkörös simaizom rostjait, így szabaddá vált a hosszanti simaizomréteg és a felszínén elhelyezkedő MP (Krecsmarik és mtsai., 2006).

3. 4. 2. Immunhisztokémiai festések

A myentericus összneuronszám változását HuC/HuD pán-neuronális marker, míg a myentericus nitreg neuronok kvantitatív változását nNOS ellen termeltetett ellenanyaggal végzett immunhisztokémiai festés segítségével vizsgáltuk (Izbéki és mtsai., 2008; Krecsmarik és mtsai., 2006).

A mintákat először 20 percig H₂O₂-dos oldatban előkezeltük (2,5 ml PB, 1 ml metanol és 0,5 ml 30%-os H₂O₂), majd 0,05 M-os PB-ben történő mosás után 0,1% Triton X-100-at tartalmazó normál szérumban (0,1% borjú szérumban albumin, 10% normál kecske szérumban) 30 percig előinkubáltuk. A továbbiakban HuC/HuD, valamint nNOS ellen termeltetett elsődleges antitesteket, majd biotinilált fajspecifikus másodlagos antitestet, harmadlagos szérumban pedig biotinilált streptavidin tormagyökér peroxidázt használtunk (*I. táblázat*). Minden inkubációs lépés nedveskamrában, szobahőmérsékleten történt. A mintákból az elsődleges, másodlagos és harmadlagos szérumban PB-ben mosva távolítottuk el. A biotinilált streptavidin tormagyökér peroxidáz alkalmazása után az immunreakciót 3,3'-diaminobenzidin (DAB) kromogén (0,1%, 20 perc) és H₂O₂ szubsztrát (0,03%, 10 perc) alkalmazásával tettük láthatóvá. Az immunreakció specifitását az elsődleges szérumban elhagyásával negatív kontroll minták festésével ellenőriztük. Ezeken a preparátumokon immunreaktivitást nem tapasztaltunk.

Szérum	Gazda	Hígítás	Inkubáció ideje	Gyártó
anti-HuC/HuD (elsődleges)	egér	1:100	egy éjszaka	Molecular Probes, Oregon, USA
anti-nNOS (elsődleges)	nyúl	1:200	egy éjszaka	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
anti-nyúl IgG (másodlagos)	szamár	1:100	6 óra	GE Healthcare, Egyesült Királyság
anti-egér IgG (másodlagos)	birka	1:100	6 óra	GE Healthcare, Egyesült Királyság
biotinilált streptavidin tormagyökér peroxidáz (harmadlagos)		1:100	egy éjszaka	GE Healthcare, Egyesült Királyság

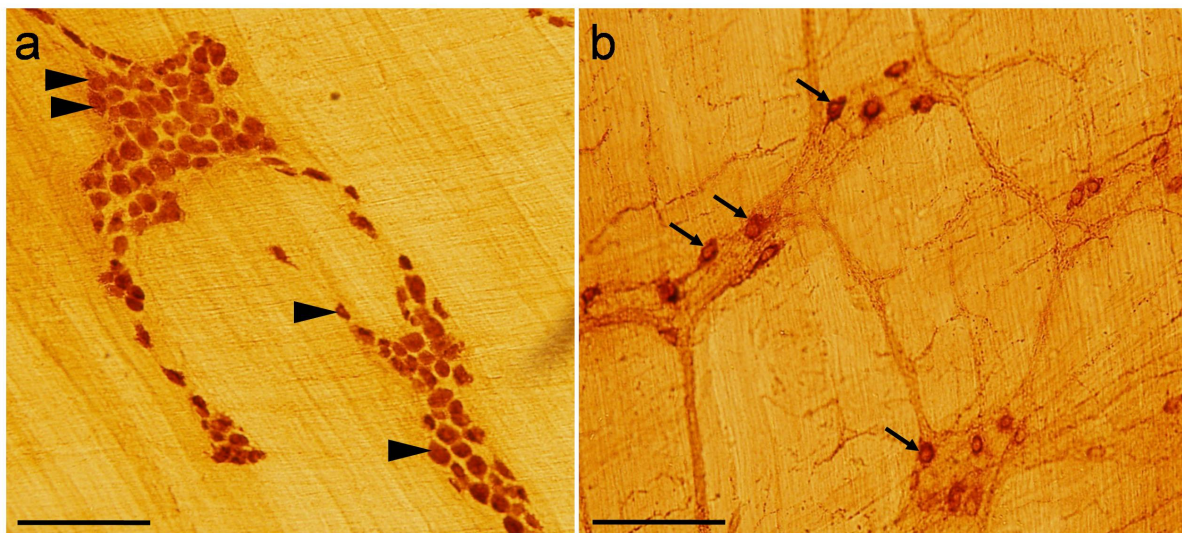
1. táblázat Immunhisztokémiai festések során használt antitestek és fontosabb jellemzőik.

Az immunhisztokémiai festést követően a mintákat glicerin:PB (0,05 M; pH=7,4) 3:1 arányú oldatában tárgylemezre helyeztük, lefedtük, majd Olympus BX51 típusú mikroszkóphoz csatlakoztatott Olympus DP70 típusú kamerával reprezentatív digitális felvételeket készítettünk róluk.

3. 4. 3. Immunhisztokémiai festések kvantitatív analízise

A myentericus összneuronszám és a nitrerg neuronok kvantitatív változásainak vizsgálatához minden kísérleti állatcsoportból 3-3 állat duodenumából, ileumból és colonjából származó megfestett bélnyúzat preparátumokról 200x-os nagyításon 20-20 digitális felvételt készítettünk. A laboratóriumunkban kifejlesztett Plexus Pattern Analysis szoftver (Román és mtsai., 2004) alkalmazásával a digitális képeken a kurzor segítségével bejelöltük az egy látótérre eső HuC/HuD-immunpozitív neuronok sejtmagjait, valamint a nNOS-immunreaktív neuronok sejtestjeit (13. ábra), melyeket a program megszámlált. A HuC/HuD-immunpozitív sejtek számát 100%-nak tekintve a nitrerg neuronok arányát az összneuronszámhoz viszonyítva, annak százalékaként adtuk meg.

Az immunhisztokémiai vizsgálatok eredményeit a GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software Inc.; California, USA) szoftver segítségével statisztikai analízisnek vetettük alá. Az ischaemiás és I/R-s állatcsoportokat kétmintás t-próbával hasonlítottuk a nekik megfelelő álműtött állatcsoportokhoz. Tesztjeink során teljesültek a statisztikai próba feltételei (random mintavétel, függetlenség, varianciák homogenitása). Az így kapott eredményeket oszlopdiagramokon ábrázoltuk, az értékeket átlag±SEM formában tüntettük fel. A szignifikancia szintjét $p < 0,05$ valószínűségi értékben határoztuk meg.



13. ábra Reprezentatív fénymikroszkópos felvételek az ileumból készített bélnyúzat preparátumokról HuC/HuD (a) és nNOS (b) immunhisztokémiai festés után a myentericus plexusban. Plexus Pattern Analysis szoftver segítségével meghatároztuk az egy látótérre eső HuC/HuD-immunpozitív sejtmagok (nyílhegyek), valamint nNOS-immunreaktív sejtestek (nyilak) számát. Lépték: 250 μ m.

3. 5. Oxidatív és nitrozatív stresszmarkerek szintjének vizsgálata

Az oxidatív és nitrozatív stresszmarkerek szintjének megállapításához a szövettani vizsgálatokhoz vett bélminták 2-3 cm-es disztális darabjait használtuk. A duodenumból, az ileumból és a proximális colonból származó béldarabokat a mesenterium mentén felvágtuk, PB-ben átmostuk, majd folyékony nitrogénben lefagyasztottuk, és a további felhasználásig - 70 °C-on tároltuk. Biokémiai vizsgálataink megkezdése előtt a fagyasztott mintákat elporítottuk.

3. 5. 1. Minták előkészítése a szöveti xantin oxidoreduktáz és mieloperoxidáz enzimaktivitás, valamint a nitrit/nitrát szint meghatározására

A szöveti XOR és MPO enzimaktivitás, valamint a szöveti nitrit/nitrát szint megállapításához a porított minták 50-50 mg-ját először 750 μ l H-pufferben (10 μ g/ml szója tripszin inhibitort, 154 μ g/ml dithiothreitol, 10 μ g/ml leupeptint és 261,2 μ g/ml PMSF-et tartalmazó 1 mM-os EDTA és 0,05 M-os TRIS puffer, pH=7,4) homogenizáltuk (Ultra Turrax; IKA, Németország). Ezt a minták 2 perces ultrahangos feltárása (szonikálás; Branson 32; Gemini BV, Hollandia), majd 20 perces centrifugálása (4 °C, 24000 g) követte. A XOR enzim aktivitását a lecentrifugált homogenizátum felülúszójából, a MPO

enzimaktivitást annak üledékéből mértük. A szöveti nitrit/nitrát szint megállapításához szintén a lecentrifugált homogenizátum felülúszóját használtuk.

3. 5. 1. 1. Szöveti xantin oxidoreduktáz enzimaktivitás mérés

A XOR enzimaktivitást a lecentrifugált homogenizátumok felülúszójából mértük Beckman és munkatársai (1989) kinetikus fluorometriás módszerével. A mérés során a XOR enzim természetes szubsztrátja (xantin) helyett, annak fluoreszkáló analógját, a pterint alkalmaztuk. A módszer a pterin izoxantopterinné, fluoreszcens aktivitású végterméké való átalakulásán alapszik. A reakció végtermék koncentrációját, a kinetikus reakció utolsó lépéseként, belső standardként alkalmazott ismert mennyiségű izoxantopterin hozzáadásával határoztuk meg. A reakciót a 390 nm-es hullámhosszon mért emisszió alapján Hitachi F-2000 (Hitachi, Japán) spektrofluorométerrel követtük nyomon. A módszer lépései részletesebben: a felülúszó 500 µl-ét speciális szűrők (Amicon Ultra centrifugaszűrő, Millipore; Massachusetts, USA) segítségével 15 perc centrifugálás alatt (10000g) leszűrtük. Ezt követően a szűrőben maradt mintát H-pufferrel 300 µl végtérfogatra kiegészítve kétszer 2 perc 1000g-s centrifugálással kimostuk a szűrőkből. Először 10 µl pterin oldatot (1 mM pterin, 0,02 M NaOH) adtunk hozzá, melyet az enzim XO formája alakít át izoxantopterinné. A színreakció megjelenése után az enzim XDH formáját is aktiváló 10 µl metilénkéket (1 mM) adtunk a mintához. A reakciót a konvencionálisan meghatározott abszorbanciaérték elérésekor 50 µl allopurinol oldattal (1 mM allopurinol, 0,013 M NaOH) leállítottuk. Ezt követően adtuk a reakcióelegyhez a 15 µl izoxantopterin oldatot (5 µM izoxantopterin, 0,1 M NaOH). Eredményeinket a XO és a XDH formák által átalakított szubsztrát mennyiségének kifejezésével, az időre és a minta fehérjetartalmára vonatkoztatva, µmol/perc x mg protein formában adtuk meg.

3. 5. 1. 2. Szöveti mieloperoxidáz enzimaktivitás mérés

A szöveti MPO enzimaktivitását a szöveti homogenizátum üledékéből határoztuk meg Kuebler és mtsai. (1996) módszere alapján. Az üledéket 750 µl 0,5% hexadecil-trimetil-ammónium-bromidot tartalmazó kálium-foszfát pufferben (0,05 M, pH=6,0) reszuszpendáltuk. A sejteket háromszor ismételt fagyasztás-olvasztás módszerrel tártuk fel. Ezt követően a homogenizátumot 20 percig (4 °C, 24000 g) centrifugáltuk, majd az így nyert felülúszót 1 órán át 60 °C-os vízfürdőben inkubáltuk. Ezt követően a mintákat hexa-bis-decyltriethylammoniumbromidot tartalmazó kálium-foszfát pufferrel húszszorosra hígítottuk.

A MPO aktivitásának meghatározása a 3,3'-5,5'-tetrametilbenzidin (TMB) H_2O_2 által katalizált oxidációján alapszik. A szövetből mérhető MPO aktivitást a vizsgált szövetbe infiltrálódott leukociták száma, s azok MPO tartalma határozza meg. Ezért vizsgálataink során nem a klasszikus szubsztrát/termék koncentráció változáson alapuló enzimaktivitást mértük, hanem közvetlenül a szövethomogenizátum MPO mennyiségét határoztuk meg. A kalibrációs görbét standard MPO oldatból (5 U, Sigma Aldrich, Missouri, USA) készített felező hígítási sor segítségével készítettük és a TMB- H_2O_2 reakció mértéke alapján határoztuk meg a MPO mennyiségét. A minták 100-100 μl -éhez 100 μl TMB-t (1 mg/ml, 1M-os DMSO-ban oldva) és 750 μl 0,0034% H_2O_2 -ot tartalmazó kálium-foszfát puffert (0,08 M) adtunk. A reakcióelegyet 37 °C-os vízfürdőben 5 percig inkubáltuk, majd a reakciót kénsavval (200 μl , 2M) leállítottuk. Az oxidált TMB színreakcióját 455 nm-en Shimadzu UV-1601 típusú fotométerrel (Shimadzu; Japán) mértük meg. A MPO által átalakított szubsztrát mennyiségét a minta fehérjetartalmára vonatkoztatva, U/mg protein formában adtuk meg.

3. 5. 1. 3. Szöveti nitrit/nitrát szint meghatározás

A szöveti nitrit/nitrát szint meghatározásához a homogenizátum felülúszójának 250 μl -ét használtuk. A mérés Moshage és munkatársai (1995) módszerén alapul. Ennek lényege a szöveti nitrát tartalom enzimatis nitritté történő redukciója, melyet a nitrit színes azo-vegyületté való alakítása követ. A kalibrációs görbét standard nitrit (1 mM NaNO_2) és nitrát oldatból (1 mM NaNO_3) készített hígítási sor segítségével számoltuk ki. A mintákat 0,1 M-os K_2HPO_4 és 0,1 M-os KH_2PO_4 oldatokkal térfogatuk tizenegyszeresére hígítottuk úgy, hogy a pH végül 7,49 és 7,51 közé essen. Ezt követően a szöveti nitrát tartalmat 10 μl FAD (0,25 mg/ml), 20 μl NADPH (1,667 mg/ml) és 20 μl nitrát reduktáz (10 U; Sigma Aldrich, Missouri, USA) jelenlétében nitritté alakítottuk (30 perc, 37 °C). A színreakció kiváltásához a mintákhoz Gries oldatot (550 μl ; 25 mg/ml foszforsav, 5 mg/ml szulfanilamid, 0,5 mg/ml N-(1-naftil)-etilén-diamin) adtunk, majd 10 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Majd az 560 nm-en mért abszorbanciák alapján (Shimadzu UV-1601; Shimadzu, Japán) külön megmértük a minták eredeti, és az enzimatis átalakítás után kapott összes (azaz eredeti nitrit és nitrátból konvertált nitrit) nitrit koncentrációját. Eredményeinket a minta nitrit/nitrát koncentrációjának a minta fehérjetartalmára vonatkoztatva, $\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein formában adtuk meg.

3. 5. 2. Szöveti nitro tirozin szint meghatározás

A szöveti nitro tirozin szint meghatározásához a porított minták 50 mg-ját 200 µl 10,4% szacharóz tartalmú puffer (2,336 mg/ml HEPES, 36,4 µg/ml Na₂EDTA, 151 µg/ml dithiothreitol, 9,8 µg/ml szója tripszin inhibitor, 9,8 µg/ml leupeptin) és 2,5 µl PMSF oldat hozzáadásával (125 µg/ml, etanolban oldva) homogenizáltuk (Ultra Turrax; IKA, Németország). Ezt a minták 2 perces ultrahangos feltárása (szonikálás; Bransonic 32; Gemini BV, Hollandia), majd 20 perces centrifugálása (4 °C, 15000 g) követte. Az így nyert felülúszó 50-50µl-ét egy éjszakán át 50 µl nyúlban termeltetett anti-nitro tirozin IgG-vel (egér anti-nyúl IgG; Cayman Chemical; Michigan, USA) és nitro tirozin acetilkolin-észterázal (Cayman Chemical; Michigan, USA) inkubáltuk a mikrotiterekben. A minták mosását követően 200 µl Ellman reagenst (Cayman Chemical; Michigan, USA) mértünk a lyukakba, majd 45 perc inkubációt követően a színreakciót 405 és 420 nm-en Multiskan EX típusú fotométerrel (Thermo Fischer Scientific; Massachusetts, USA) mértük meg. A minták nitro tirozin koncentrációját 500 µM nitro tirozin oldat (Sigma Aldrich, Missouri, USA) felező hígításával készített kalibrációs görbe alapján (15,8-250 µM) számoltuk ki, s a minta fehérjetartalmára vonatkoztatva, ng/mg protein formában adtuk meg.

3. 5. 3. A biokémiai minták fehérjetartalmának meghatározása

A szöveti XOR és MPO enzimaktivitását, a szöveti nitrit/nitrát és nitro tirozin szintet minden esetben a fehérjetartalomra vonatkoztatva adtuk meg. Minden mintából a reagensek hozzáadása előtt a fehérjetartalom méréséhez 100-100 µl-t tettünk félre. A minták fehérjetartalmának mérésére Lowry és munkatársai (1951) módszerét alkalmaztuk. A kalibrációs görbét 10 mg/ml albumin (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) oldatból készített hígítási sor segítségével számoltuk ki. A mintákat 2 ml 2%-os nátrium-karbonát oldattal (0,1 M NaOH, 0,2 mg/ml nátrium-kálium-tartarát, 0,1 mg/ml réz-szulfát) hígítottuk, majd szobahőmérsékleten 10 percig állni hagytuk. Ezt követően 300 µl Folin-reagenst (2 N; Sigma-Aldrich, Missouri, USA) adtunk a mintához, majd szobahőmérsékleten fél óráig állni hagytuk. A színreakciót Shimadzu UV-1601 típusú fotométerrel (Shimadzu; Japán) 742 nm-en mértük meg.

3. 5. 4. A biokémiai vizsgálatok eredményének statisztikai analízise

A biokémiai eredmények statisztikai analízisét a GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software Inc.; California, USA) szoftver segítségével végeztük. Az ischaemiás és I/R-s állatcsoportokat kétmintás t-próbával hasonlítottuk a nekik megfelelő álműtött állatcsoportokhoz. Tesztjeink során a statisztikai próba feltételei (random mintavétel, függetlenség, varianciák homogenitása) maradéktalanul teljesültek. Eredményeinket oszlopdiagramokon ábrázoltuk, az értékeket átlag \pm SEM formában tüntettük fel. A szignifikancia szintjét $p < 0,05$ valószínűségi értékben határoztuk meg.

4. EREDMÉNYEK

4. 1. Általános megfigyelések

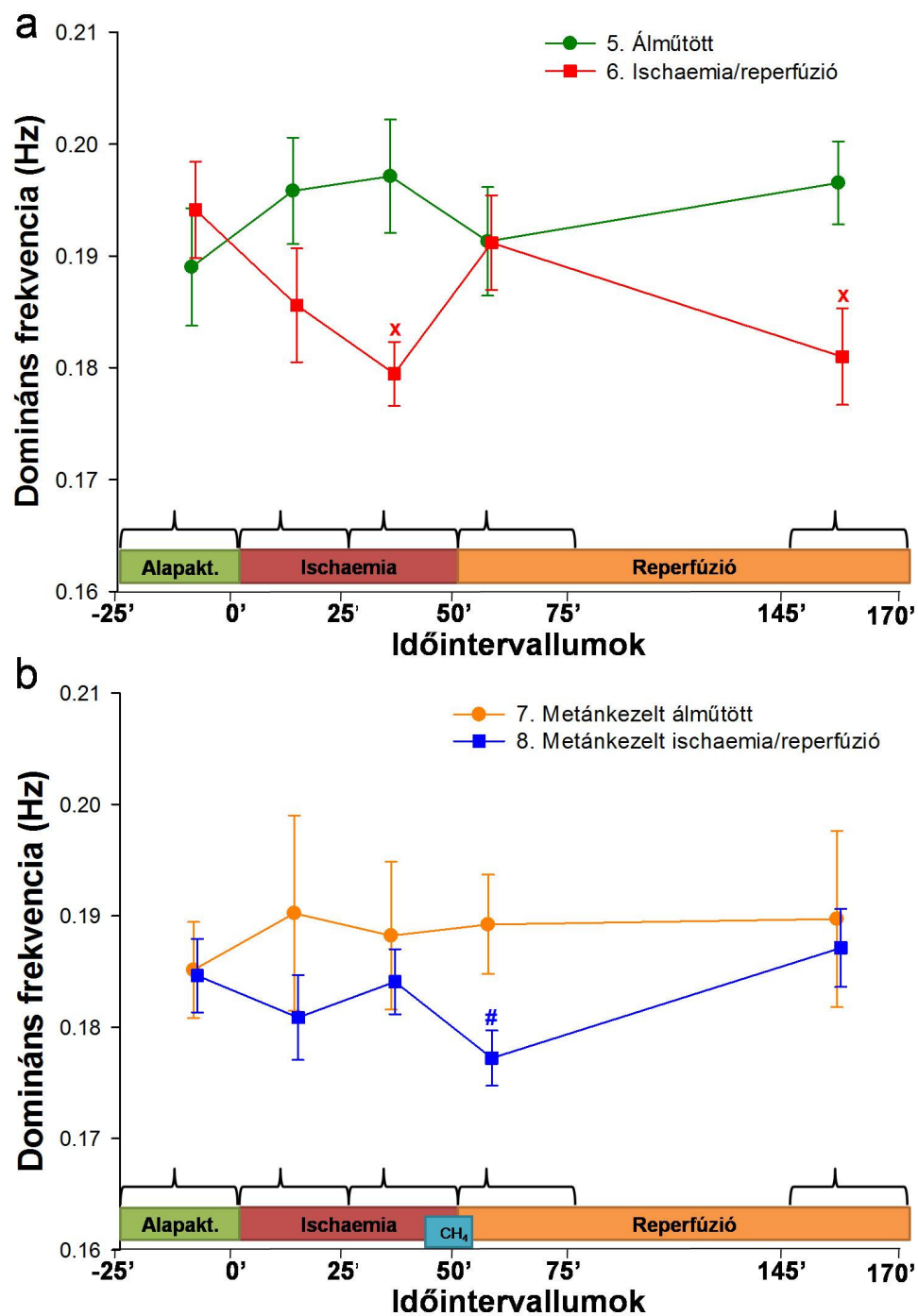
Az artériás középnyomás és az artériás vér vérgáz szintje minden vizsgált állat esetében a ketamin és xylazin keverékével altatott patkányokra jellemző normál értékek (Hem, 2010) határain belül voltak.

Az AMS elszorításával a vékonybél mesenteriumában futó erek élénkpirosból bordó színűvé váltak. A fizioiógias körülmények között rózsaszínű duodenum hipoxia hatására pár másodperc alatt teljesen ellilult, a jejunum és az ileum szürkéslila árnyalatúvá vált, a colon elhalványult. Az egyes bélszakaszok színváltozásai az adott szakasz ischaemiás állapotának súlyosságát jelzik. Az AMS felengedését követően, a véráram megindulásával a bélcsatorna egyes szakaszainak színe fokozatosan az eredetihez hasonló árnyalatot vett fel. A 2. és 6. állatcsoportokban mintavételkor a bélcsatorna lumenében a villusokat az ischaemiás károsodások következtében leváló epithelium rétegből származó fehéres nyálka borította.

4. 2. A bélfal mioelektromos aktivitásának változása az ischaemia, az ischaemia/reperfúzió, valamint a kapcsolódó metán belélegzés hatására

A bélcsatorna motoros funkcióinak az ischaemia, az ischaemiát követő reperfúzió, valamint az ischaemiás fázis végén és a reperfúziós periódus kezdetén alkalmazott metánkezelés okozta régió-specifikus változásainak vizsgálatához az állatok bélfalából mioelektromos jeleket vezettünk el. A regisztrátumok Fourier-transzformációját követően kapott domináns frekvencia értékek a bélcsatorna simaizmainak az adott időintervallumban leggyakrabban előforduló összehúzóási frekvenciáját jellemzik.

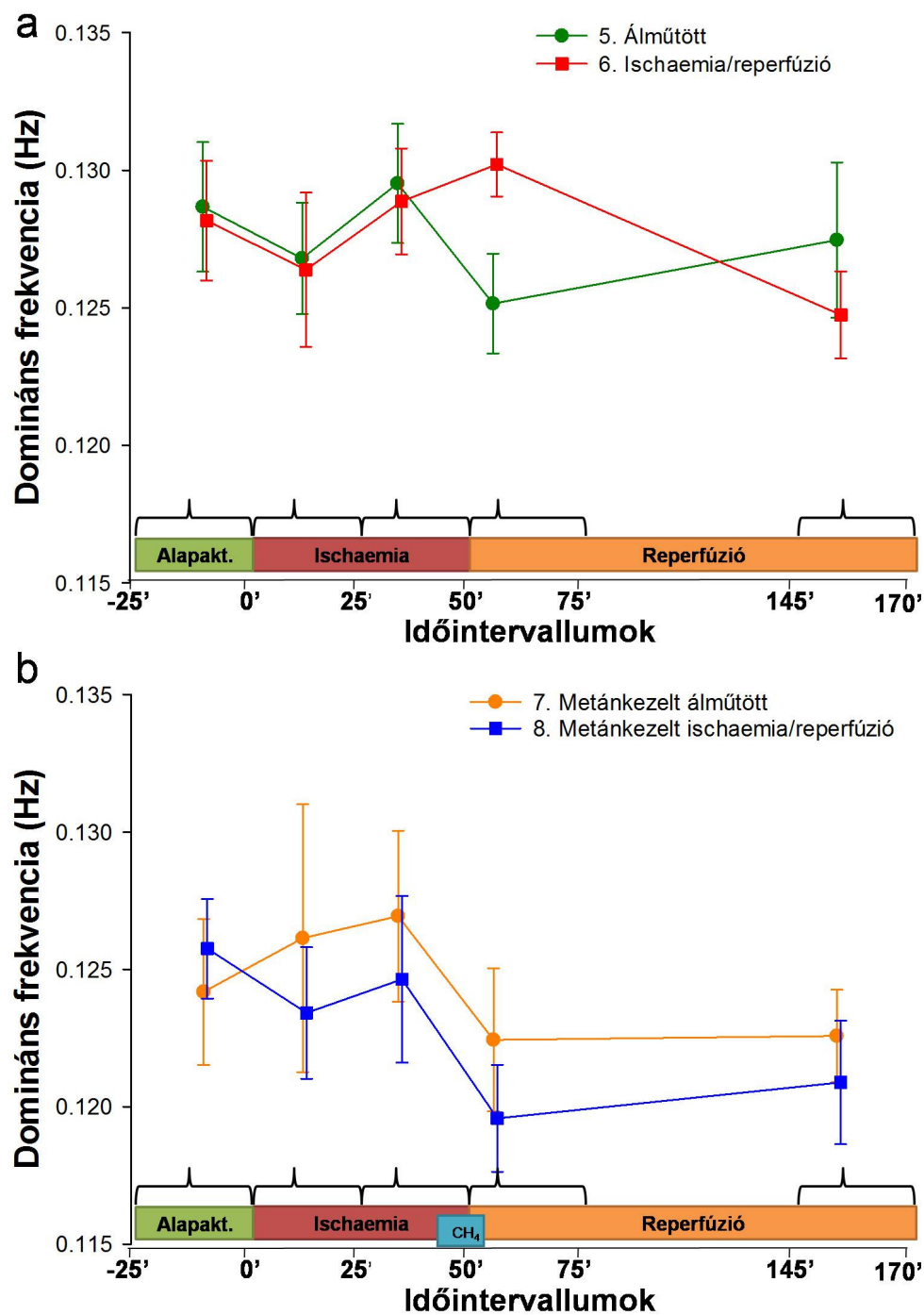
A vékonybél falában mért domináns frekvencia értékek az álműtött állatcsoportban az egyik vizsgálati időintervallumban sem tértek el jelentős mértékben az alapaktivitás frekvencia értékeitől (14. ábra a). Ugyanakkor az I/R-s állatcsoportban a vékonybél falában mért frekvencia értékek már az ischaemiás periódus első 25 percétől meredeken csökkentek, s ez a csökkenés az ischaemiás periódus végéig folytatódott. Bár az ischaemiás fázis második 25 percének frekvencia értékei az álműtött állatcsoport értékeihez képest szignifikánsan alacsonyabbak voltak (5. állatcsoport: $0,197 \pm 0,00506$ Hz; 6. állatcsoport: $0,179 \pm 0,00286$ Hz; $p < 0,05$), az I/R-s állatcsoport vékonybélfalában mért alapaktivitáshoz képest ezek az értékek nem bizonyultak statisztikailag szignifikánsnak (14. ábra a).



14. ábra A vékonybél falában mért domináns frekvencia értékek változása az ischaemiás és a reperfúziós periódus alatt (a) az álműtött és ischaemia/reperfúzió, valamint (b) a metánkezelt álműtött és metánkezelt ischaemia/reperfúziós csoportokban. Alapakt.= alapaktivitás. Átlag \pm SEM. X $p < 0,05$ az 5. és 6. állatcsoport között; # $p < 0,05$ a 7. és 8. állatcsoport között.

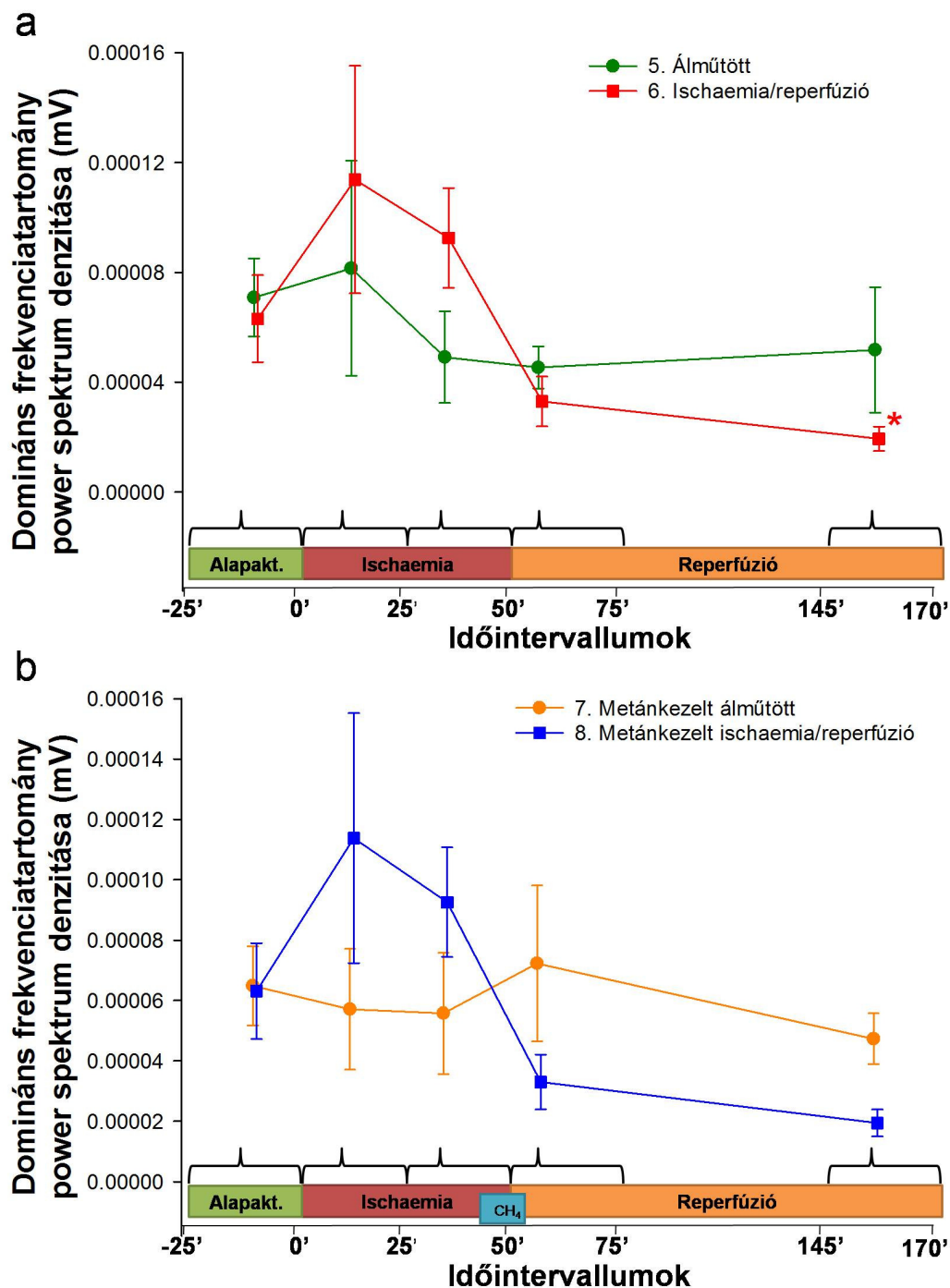
Az I/R-s állatcsoport vékonybél falában mért frekvencia értékek a reperfúzió első 25 percében az alapaktivitáshoz közeli értékre tértek vissza, majd a reperfúziós fázis végére ismét jelentősen lecsökkentek. Ekkor az I/R-s állatcsoport vékonybél falában mért értékek az álműtött állatcsoport értékeinél szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyultak (5. állatcsoport: $0,197 \pm 0,00372$ Hz; 6. állatcsoport: $0,181 \pm 0,00431$ Hz; $p < 0,05$), az alapaktivitástól azonban ekkor sem különböztek szignifikánsan (14. ábra a). Az ischaemiás fázis utolsó 10 és a reperfúziós periódus első 5 percében belélegeztetett metán a reperfúzió kezdeti szakaszán a metánkezelt álműtött csoporthoz képest szignifikáns csökkenést eredményezett (7. állatcsoport: $0,189 \pm 0,00446$ Hz; 8. állatcsoport: $0,179 \pm 0,00237$ Hz; $p < 0,05$). A metánkezelt I/R-s állatcsoport alapaktivitásához képest azonban nem volt szignifikáns eltérés. A reperfúziós fázis végén a metánkezelt I/R-s állatcsoport bél falában mért frekvencia értékek megegyeztek a metánkezelt álműtött állatok bél falában mért értékekkel (14. ábra b).

A vastagbél falában mért domináns frekvencia értékek mind az álműtött, mind az I/R-s állatcsoportban az ischaemia első 25 perce alatt az alapaktivitáshoz képest csökkentek, majd az ischaemiás fázis második 25 percében mindkét állatcsoportban növekedtek (15. ábra a). Az I/R-s állatcsoport vastagbél falában mért frekvencia értékek a reperfúzió első 25 perce alatt tovább növekedtek, de az értékek sem az alapaktivitástól sem az álműtött csoport értékeitől nem tértek el szignifikánsan (15. ábra a). A reperfúziós fázis végére mindkét állatcsoport vastagbél falában mért frekvencia értékek az alapaktivitáshoz közeli értéket mutattak (15. ábra a). A kísérleti protokoll szerint alkalmazott metán belélegzés sem a metánkezelt álműtött csoporthoz, sem az alapaktivitáshoz képest nem okozott szignifikáns változást. (15. ábra b).



15. ábra A vastagbél falában mért domináns frekvencia értékek változása az ischaemiás és a reperfúziós periódus alatt (a) az álműtött és ischaemia/reperfúziós, valamint (b) a metánkezelt álműtött és metánkezelt ischaemia/reperfúziós csoportokban. Alapakt.= alapaktivitás. Átlag \pm SEM.

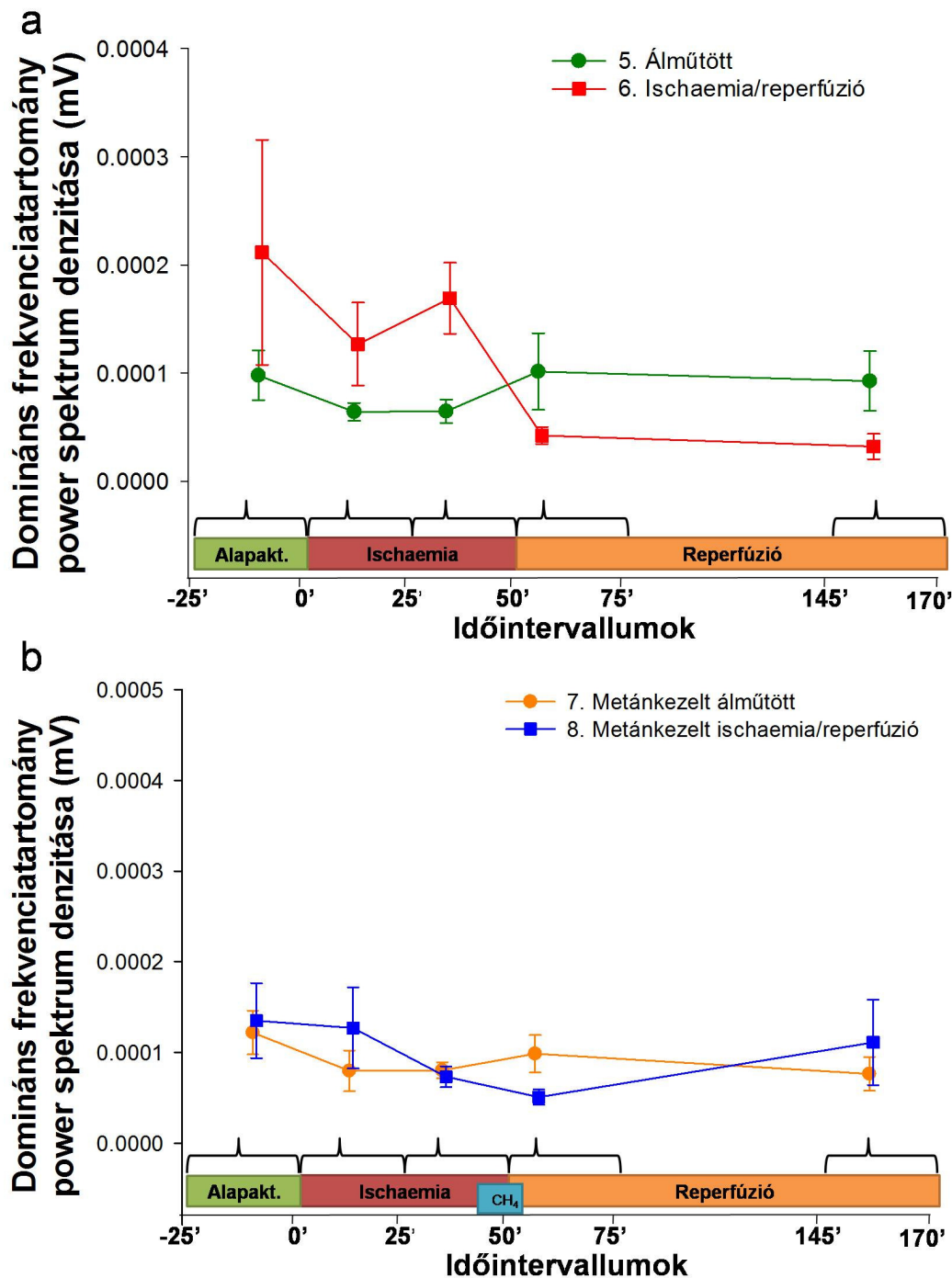
A regisztrátumok Fourier-transzformációját követően a domináns frekvencia értékek mellett a domináns frekvenciához tartozó PSD értékeket is megkaptuk. A PSD értékek a bél fal izomkontrakcióinak nagyságát, amplitúdóját jellemzik. A vékonybél falában mért PSD értékek az álműtött csoport állataiban a vizsgálat ideje alatt nem változtak jelentős mértékben (16. ábra a). Az I/R-s állatcsoport vékonybél falában mért PSD értékek az ischaemia első 25 percében erőteljesen növekedtek. Az ischaemia második 25 percében az I/R-s állatcsoport vékonybél falából mért PSD értékek jelentősen magasabbak voltak mind az alapaktivitásnál, mind az álműtött állatcsoport értékeinél, a különbség azonban sem az alapaktivitás, sem az álműtött állatcsoport értékeihez képest nem volt szignifikáns. A reperfúzió első 25 percében az I/R-s állatcsoport vékonybél falában mért PSD értékek meredeken csökkentek. Az értékek a reperfúziós fázis végére kisebb mértékben, de tovább csökkentek. A reperfúzió utolsó 25 percében az I/R-s állatcsoport vékonybél falában mért PSD értékek jelentősen kisebbek voltak az álműtött csoport állataiban mért értékeknél, és szignifikánsan kisebbek voltak az alapaktivitásnál (alapaktivitás: $0,0000631 \pm 0,0000159$ mV; reperfúzió utolsó 25 perce: $0,0000194 \pm 0,0000446$ mV; $p < 0,05$) (16. ábra a). Az ischaemiás fázis utolsó 10 és a reperfúziós periódus első 5 percében alkalmazott metán belélegzés során a metánkezelt I/R csoport vékonybél falában mért PSD értékek sem a metánkezelt álműtött csoport, sem saját alapaktivitás értékeitől nem különböztek szignifikánsan (16. ábra b).



16. ábra A vékonybél domináns frekvenciájához tartozó power spektrum denzitás értékek változása az ischaemiás és a reperfúziós periódus alatt (a) az álmutótt és ischaemia/reperfúziós, valamint (b) a metánkezelt álmutótt és metánkezelt ischaemia/reperfúziós csoportokban. Alapakt.= alapaktivitás. Átlag \pm SEM; * $p < 0,05$ az alapaktivitáshoz viszonyítva.

Az álmutótt állatcsoport vastagbélfalában mért PSD értékek egyik vizsgált időintervallumban sem változtak jelentős mértékben (17. ábra a). Az I/R-s állatcsoport vastagbélfalában mért PSD értékek hullámszerűen változtak az ischaemia alatt, majd a reperfúzió első 25 percében az álmutótt állatcsoport PSD értékei alá csökkentek és a

reperfúziós fázis végéig alacsonyak maradtak. Szignifikáns eltérés ebben a csoportban sem az alapaktiváshoz, sem az álműtött csoport értékeihez képest nem volt kimutatható (17. ábra a). A kísérleti protokoll szerint az ischaemiás fázis végén és a reperfúziós periódus kezdetén belélegzett metán sem a metánkezelte álműtött, sem a metánkezelte I/R-s csoportok állatainak vastagbélfalából mért PSD értékeket nem változtatta meg jelentős mértékben (17. ábra b).



17. ábra A vastagbél domináns frekvenciájához tartozó power spektrum denzitás értékek változása az ischaemiás és a reperfúziós periódus alatt (a) az álműtött és ischaemia/reperfúziós, valamint (b) a metánkezelte álműtött és metánkezelte ischaemia/reperfúziós csoportokban. Alapakt.= alapaktivitás. Átlag \pm SEM.

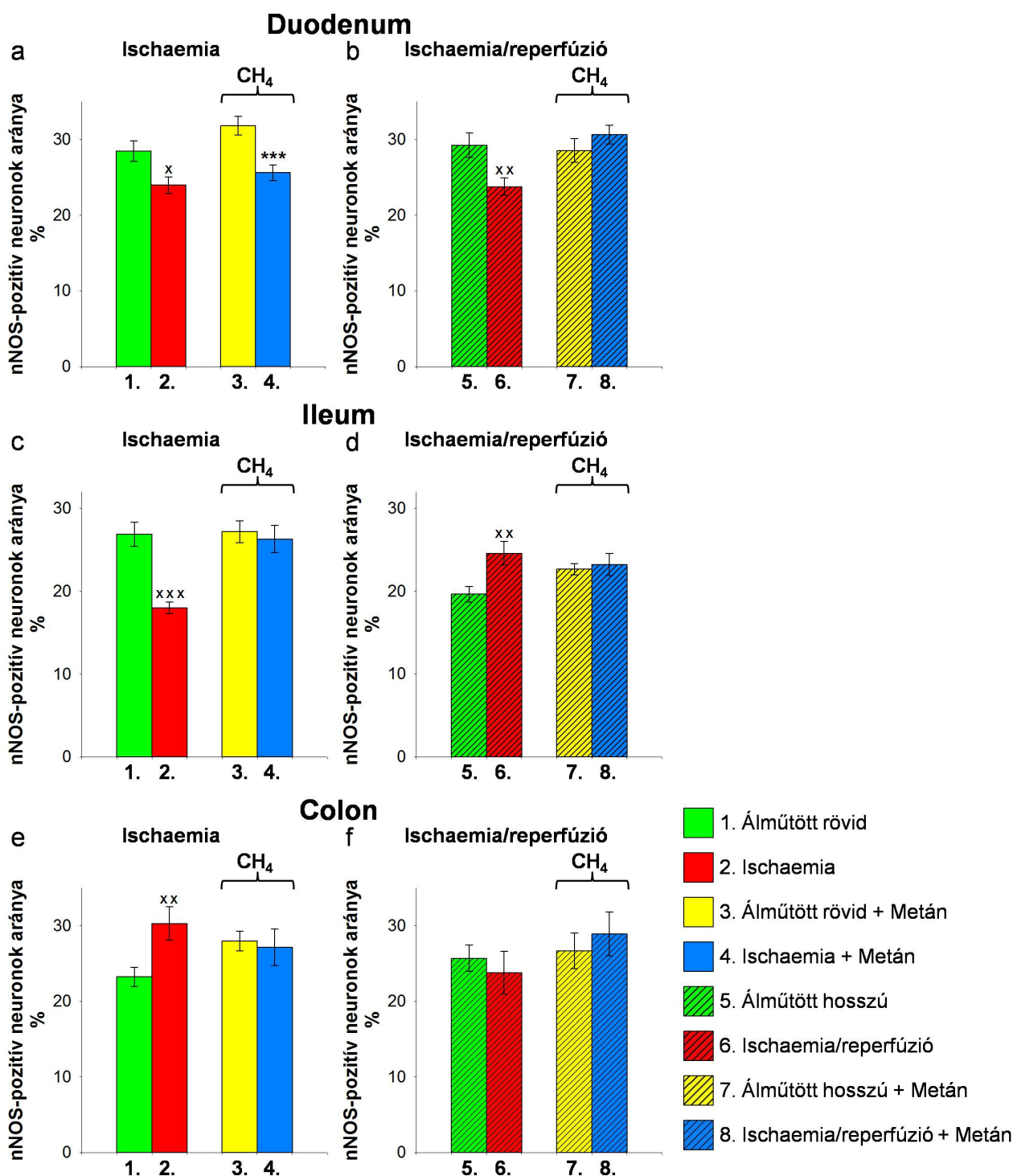
4. 3. A nitrerg neuronok összneuronszámhoz viszonyított arányának változása az ischaemia, az ischaemia/reperfúzió, valamint a kapcsolódó metán belélegzés hatására

A nitrerg neuronok összneuronszámhoz viszonyított arányának az ischaemia, az ischaemiát követő reperfúzió, valamint az ischaemiás fázis utolsó 10 és a reperfúziós periódus első 5 percében alkalmazott metánkezelés okozta régió-specifikus változásainak vizsgálatához az 1-8. állatcsoportok három bélszakaszából gyűjtött bélnyúzat preparátumokon kvantitatív immunhisztokémiai vizsgálatokat végeztünk. Az összneuronszám meghatározásához pán-neuronális markerként a bélnyúzat preparátumokon HuC/HuD (13. ábra a), a nitrerg neuronok számának meghatározására nNOS (13. ábra b) immunhisztokémiai festést végeztünk. Ezt követően megszámláltuk az egy látótérre eső immunreaktív neuronok számát. Az álműtött állatcsoportok HuC/HuD- és nNOS-immunpozitív neuronjainak száma megegyezett korábbi adatainkkal (Krecsmarik és mtsai., 2006). A HuC/HuD-immunpozitív neuronok száma egyik kísérletes állatcsoportban sem tért el szignifikánsan az álműtött állatcsoportokban számolt értékektől (az adatok nincsenek feltüntetve).

A nitrerg neuronok összneuronszámhoz viszonyított aránya az ischaemiás állatcsoport duodenumából és ileumából készült bélnyúzat preparátumokon szignifikánsan lecsökkent a kontroll mintákon számolt értékekhez képest (duodenum: 1. állatcsoport: $28,5 \pm 1,4\%$; 2. állatcsoport: $23,9 \pm 1,1\%$; $p < 0,05$; ileum: 1. állatcsoport: $26,9 \pm 1,5\%$; 2. állatcsoport: $17,9 \pm 0,7\%$; $p < 0,001$) (18. ábra a, c). Ezzel szemben a colonból készült bélnyúzat preparátumokon a nitrerg neuronok aránya a kontroll mintákon számolt értékekhez képest szignifikánsan megnőtt (1. állatcsoport: $23,3 \pm 1,2\%$; 2. állatcsoport: $30,3 \pm 2,2\%$; $p < 0,01$) (18. ábra e). A duodenális mintákon a nitrerg neuronok aránya a hipoperfúzió során alkalmazott metán belélegzés után is szignifikánsan alacsonyabb volt az álműtött állatcsoportok mintáin számolt értékeknél (3. állatcsoport: $31,8 \pm 1,4\%$; 4. állatcsoport: $25,6 \pm 1,0\%$; $p < 0,001$) (18. ábra a). A metánkezelt ischaemiás csoport állatainak ileumából és colonjából nyert mintákon ugyanakkor a nitrerg neuronok aránya megegyezett a kontroll mintákon számolt értékekkel (18. ábra c, e).

A nitrerg neuronok összneuronszámhoz viszonyított aránya a reperfúzió után nyert duodenális mintákon is szignifikánsan alacsonyabb volt a kontroll mintákon számolt értékeknél (5. állatcsoport: $29,3 \pm 1,6\%$; 6. állatcsoport: $23,8 \pm 1,1\%$; $p < 0,01$) (18. ábra b). Az ileális mintákban azonban a reperfúziót követően a nitrerg neuronok aránya az álműtött állatok mintáin számolt értékekhez képest szignifikánsan magasabb volt (5. állatcsoport: $19,6 \pm 0,9\%$; 6. állatcsoport: $24,6 \pm 1,4\%$; $p < 0,01$) (18. ábra d). Amikor a metán belélegzés a

reoxigenizáció során is folytatódott, a nitrerg neuronok aránya a duodenális (18. ábra b), az ileális (18. ábra d) és a colonból készült mintákon (18. ábra f) is megegyezett az álműtött állatok mintáin számolt értékekkel.



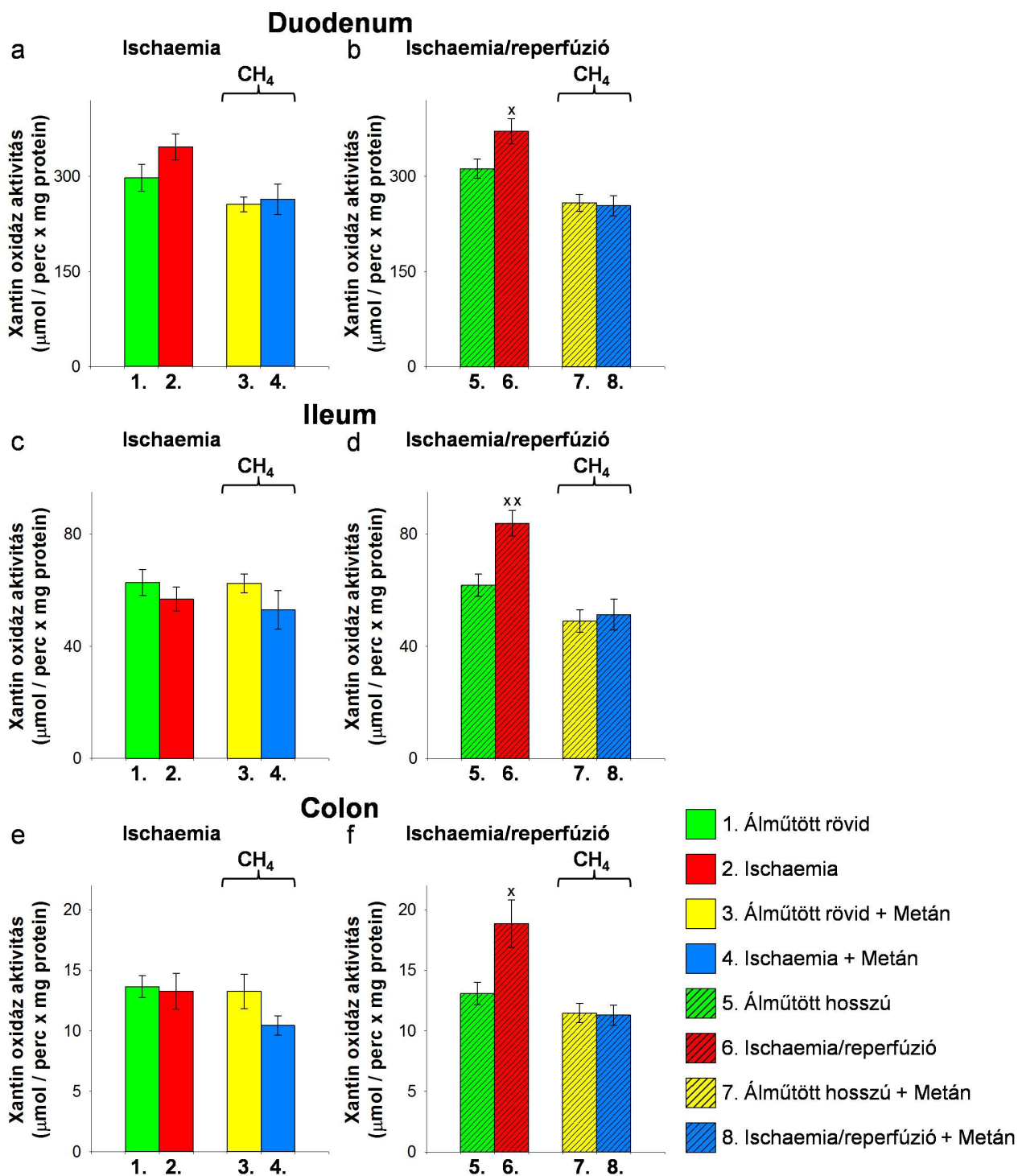
18. ábra A nitrerg myentericus neuronok összneuronszámhoz viszonyított aránya az álműtött (1., 3., 5., 7.), az ischaemiás (2., 4.) és az ischaemia/reperfúziós (6., 8.) állatcsoportok duodenumából (a, b), ileumából (c, d) és colonjából (e, f) készített bélnyúzat preparátumokon. Átlag \pm SEM; X $p < 0,05$; XX $p < 0,01$; XXX $p < 0,001$ az 1. és 2., valamint 5. és 6. állatcsoportok között; *** $p < 0,001$ a 3. és 4., valamint 7. és 8. állatcsoportok között.

4. 4. Oxidatív és nitroztív stresszmarkerek szintjének változása az ischaemia, az ischaemia/reperfúzió, valamint a kapcsolódó metán belélegzés hatására

4. 4. 1. Szöveti xantin oxidoreduktáz aktivitás változása

A vizsgált bélszakaszok oxidatív stressz szintjének a különböző kísérleti körülmények között bekövetkező változásait a ROS előállításában szerepet játszó kulcsenzim, a XOR aktivitásának mérésével jellemeztük. A XOR aktivitás értékében az álműtött állatcsoport különböző bélszakaszai között jelentős különbségek voltak. A duodenális minták XOR aktivitása megközelítőleg ötszöröse volt az ileális mintákénak (1. állatcsoport duodenum: $297,7 \pm 21,2$ $\mu\text{mol/perc} \times \text{mg protein}$; ileum: $62,8 \pm 4,6$ $\mu\text{mol/perc} \times \text{mg protein}$), és körülbelül húszszorosa a colonból származó minták értékeinek (1. állatcsoport colon: $13,7 \pm 0,9$ $\mu\text{mol/perc} \times \text{mg protein}$). A XOR aktivitása sem az ischaemia, sem a metán belélegzés hatására nem változott egyik vizsgált bélszakaszban sem (19. ábra a, c, e).

Az ischaemiát követő reperfúzió azonban mindhárom bélszakaszból származó szövetmintában szignifikánsan fokozta a szöveti XOR aktivitását (duodenum: 5. állatcsoport: $312,1 \pm 15,0$ $\mu\text{mol/perc} \times \text{mg protein}$; 6. állatcsoport: $371,2 \pm 20,0$ $\mu\text{mol/perc} \times \text{mg protein}$; $p < 0,05$; ileum: 5. állatcsoport: $61,8 \pm 4,0$ $\mu\text{mol/perc} \times \text{mg protein}$; 6. állatcsoport: $83,8 \pm 4,6$ $\mu\text{mol/perc} \times \text{mg protein}$; $p < 0,01$; colon: 5. állatcsoport: $13,0 \pm 0,9$ $\mu\text{mol/perc} \times \text{mg protein}$; 6. állatcsoport: $18,9 \pm 1,9$ $\mu\text{mol/perc} \times \text{mg protein}$; $p < 0,05$) (19. ábra b, d, f). Metán belélegzés hatására a XOR aktivitás értékei mindhárom vizsgált bélszakaszban a kontroll értékekhez közeli szinten maradtak (19. ábra b, d, f).

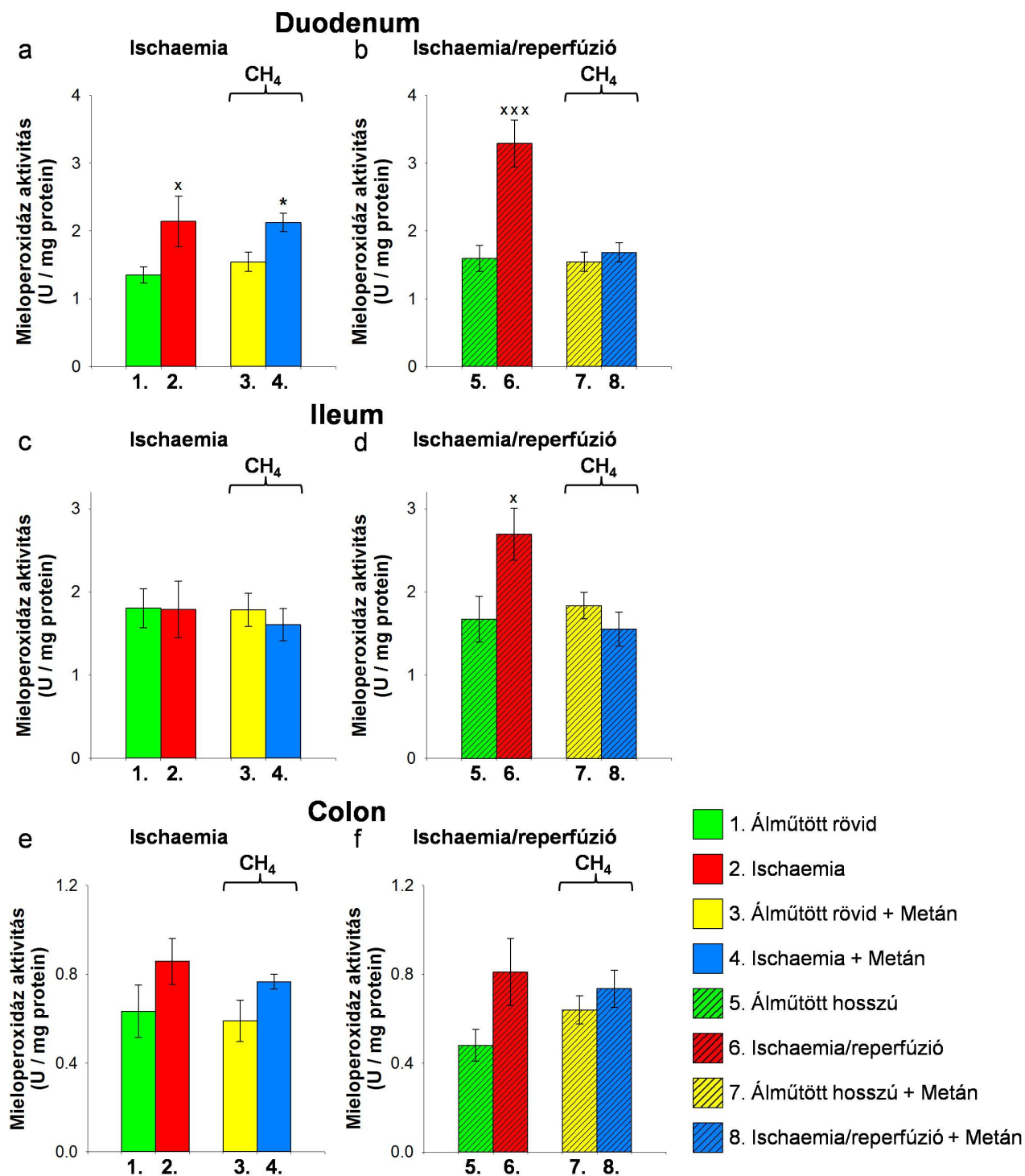


19. ábra A szöveti xantin oxidoreduktáz enzim aktivitás értékei az álműtött (1., 3., 5., 7.), az ischaemiás (2., 4.) és az ischaemia/reperfúziós (6., 8.) állatcsoportok duodenális (a, b), ileális (c, d) és colonból (e, f) származó mintáiban. Átlag \pm SEM; X $p < 0,05$; XX $p < 0,01$ az 1. és 2., valamint 5. és 6. állatcsoportok között.

4. 4. 2. Szöveti mieloperoxidáz aktivitás változása

A bélfal leukocita infiltrációjának mértékében bekövetkező változásokat a különböző kísérleti körülmények között a bélfal szöveti MPO aktivitásának meghatározásával követtük. A szöveti MPO aktivitás értékek az álműtött állatok duodenumából és ileumából származó mintákban közel azonosak voltak (1. állatcsoport duodenum: $1,8 \pm 0,2$ U/mg protein; ileum: $1,4 \pm 0,1$ U/mg protein), a colonból származó mintákban a vékonybélben mért aktivitás értékeknek csak mintegy harmadát mértük (1. állatcsoport colon: $0,6 \pm 0,1$ U/mg protein). A MPO aktivitása a duodenumban ischaemia hatására szignifikánsan emelkedett (2. állatcsoport: $2,1 \pm 0,4$ U/mg protein; $p < 0,05$). Az ischaemiás periódus végén belélegeztetett metán a MPO emelkedett aktivitását nem befolyásolta (3. állatcsoport: $1,5 \pm 0,1$ U/mg protein; 4. állatcsoport: $2,1 \pm 0,1$ U/mg protein; $p < 0,05$) (20. ábra a). Az ileumból és a colonból származó minták MPO aktivitása sem az ischaemia, sem a metán belélegzés hatására nem változott a kontroll értékekhez képest (20. ábra c, e).

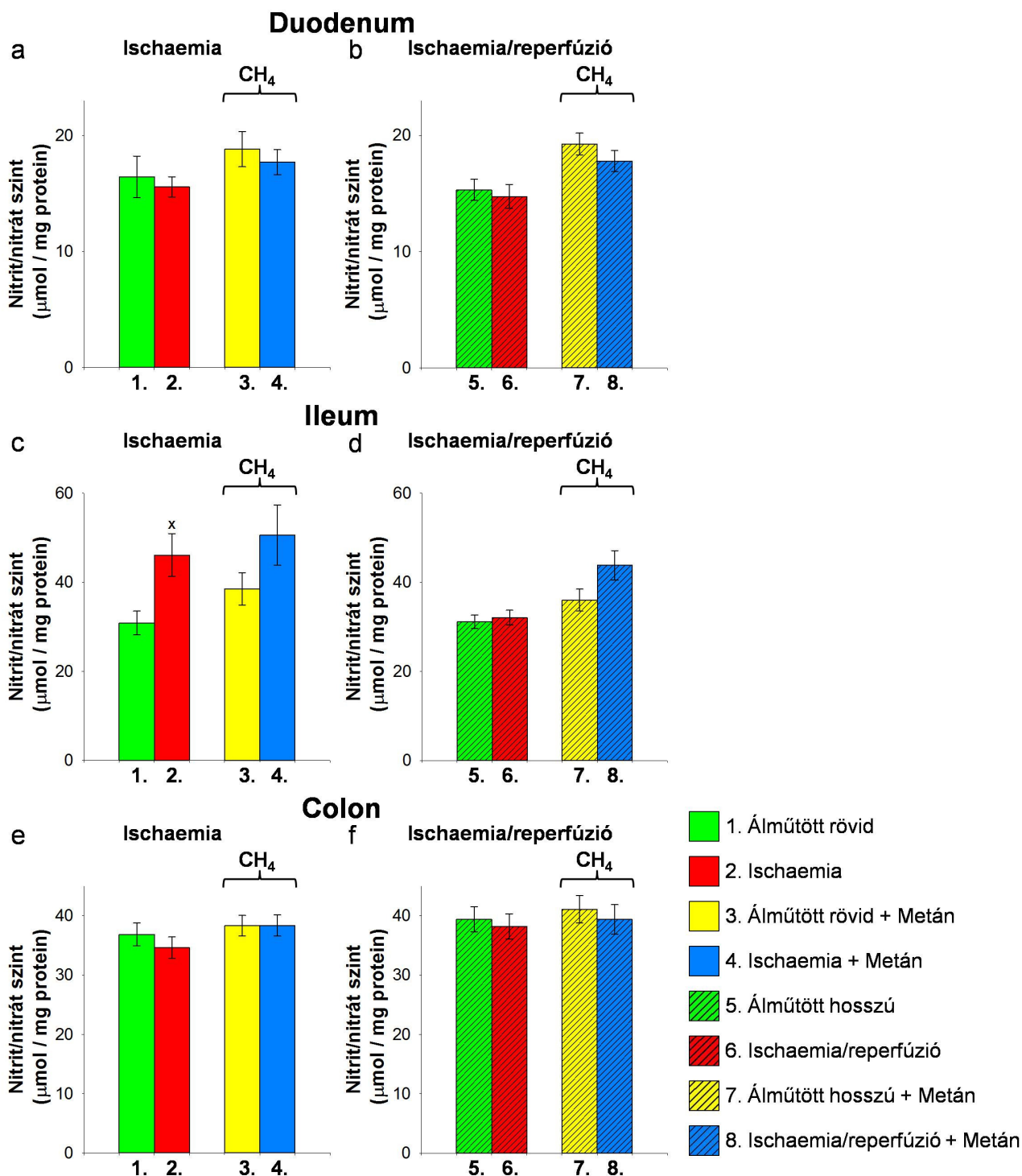
A reoxigenizáció azonban mind a duodenális (5. állatcsoport: $1,7 \pm 0,3$ U/mg protein; 6. állatcsoport: $2,7 \pm 0,3$ U/mg protein; $p < 0,05$) (20. ábra b), mind az ileális mintákban (5. állatcsoport: $1,6 \pm 0,1$ U/mg protein; 6. állatcsoport: $3,3 \pm 0,3$ U/mg protein; $p < 0,001$) (20. ábra d) szignifikánsan fokozta a szöveti MPO aktivitását. A metánkezelt I/R-s állatcsoport mindkét bélszakaszában a MPO aktivitás a kontrollhoz közeli értéket mutatott (20. ábra b, d). A colonból származó mintákban a MPO aktivitás sem az I/R, sem a metánkezelés hatására nem változott szignifikánsan (20. ábra f).



20. ábra A szöveti mieloperoxidáz enzim aktivitás értékei az álműtött (1., 3., 5., 7.), az ischaemiás (2., 4.) és az ischaemia/reperfúziós (6., 8.) állatcsoportok duodenális (a, b), ileális (c, d) és colonból (e, f) származó mintáiban. Átlag \pm SEM; X $p < 0,05$; XXX $p < 0,001$ az 1. és 2., valamint 5. és 6. állatcsoportok között; * $p < 0,05$ a 3. és 4., valamint 7. és 8. állatcsoportok között.

4. 4. 3. Szöveti nitrit/nitrát szint változása

A vizsgált bélszakaszok NO szintjének a különböző kísérleti körülmények között bekövetkező változásait a szöveti NO szint nyomonkövetésére használt marker, a szöveti nitrit/nitrát szint mérésével jellemeztük. A szöveti nitrit/nitrát szint az álműtött állatsoport ileumból és colonjából származó mintákban közel azonos volt (1. állatsoport ileum: $30,9 \pm 2,7$ $\mu\text{mol/mg}$ protein; colon: $36,9 \pm 1,9$ $\mu\text{mol/mg}$ protein), míg a duodenális minták nitrit/nitrát szintje a másik két vizsgált bélszakaszban mért értékeknek körülbelül a fele volt (1. állatsoport duodenum: $16,4 \pm 1,8$ $\mu\text{mol/mg}$ protein). A duodenum és colon nitrit/nitrát szintjét sem az ischaemia, sem az azt követő reoxigenizáció, sem az ezekhez kapcsolódó metán belélegzés nem befolyásolta (21. ábra a, b, e, f). Az ileumban ischaemia hatására a szöveti nitrit/nitrát szint szignifikánsan növekedett (1. állatsoport: $30,9 \pm 2,7$ $\mu\text{mol/mg}$ protein; 2. állatsoport: $46,1 \pm 4,8$ $\mu\text{mol/mg}$ protein; $p < 0,05$), s az ischaemiához kapcsolódó metán belélegzés hatására is ezen az emelkedett szinten maradt, bár ez az érték a kontroll értékekhez képest statisztikailag nem volt szignifikáns (21. ábra c). A reperfúziós fázis végén a nitrit/nitrát szint az ileumban is a kontrollhoz közeli értéket mutatott, s ezen a metán belélegzés sem változtatott (21. ábra d).

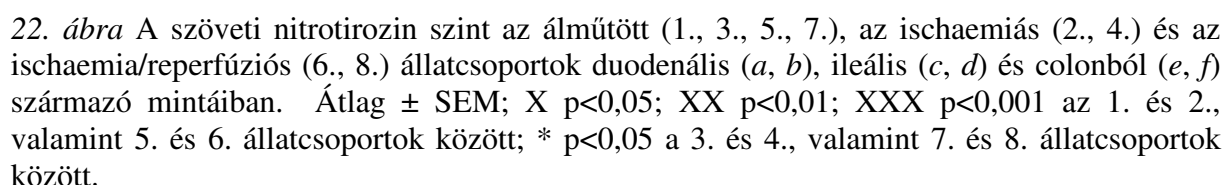


21. ábra A szöveti nitrit/nitrát szint az álműtött (1., 3., 5., 7.), az ischaemiás (2., 4.) és az ischaemia/reperfúziós (6., 8.) állatcsoportok duodenális (a, b), ileális (c, d) és colonból (e, f) származó mintáiban. Átlag \pm SEM; X $p < 0,05$ az 1. és 2., valamint 5. és 6. állatcsoportok között.

4. 4. 4. Szöveti nitro tirozin szint változása

A vizsgált bélszakaszok nitroztív stressz szintjének a különböző kísérleti körülmények között bekövetkező változásait a szöveti nitro tirozin szint mérésével jellemeztük. A szöveti nitro tirozin szint az álműtött csoport állatainak duodenális és ileális mintáiban közel azonos értékeket mutatott (1. állatcsoport duodenum: $6,5 \pm 1,4$ ng/mg protein; ileum: $4,3 \pm 0,4$ ng/mg protein), míg a colonból származó mintákban az érték ennek körülbelül egyharmada volt (1. állatcsoport colon: $1,5 \pm 0,3$ ng/mg protein). Ischaemia hatására a szöveti nitro tirozin szint a duodenális (22. *ábra a*) és a colonból származó mintákban (22. *ábra e*) jelentősen emelkedett, de a változás a kontroll mintákban mért értékekhez képest nem volt szignifikáns. Az ischaemiás fázis végén belélegeztetett metán a duodenális mintákban a kontrollhoz közeli értéken tartotta a szöveti nitro tirozin szintet (22. *ábra a*). A metánkezelt ischaemiás állatcsoport ileumából (3. állatcsoport: $2,4 \pm 0,4$; 4. állatcsoport: $3,8 \pm 0,3$; $p < 0,05$) (22. *ábra c*) és colonjából származó mintákban (3. állatcsoport: $1,4 \pm 0,3$ ng/mg protein; 4. állatcsoport: $2,4 \pm 0,3$ ng/mg protein; $p < 0,05$) (22. *ábra e*) a szöveti nitro tirozin szint szignifikánsan magasabb volt a kontroll értékeknél.

Az ischaemiát követő reperfúzió hatására mindhárom bélszakaszból származó szövetmintákban a kontrollhoz képest szignifikánsan megnőtt a szöveti nitro tirozin szint (duodenum: 5. állatcsoport: $6,9 \pm 0,9$ ng/mg protein; 6. állatcsoport: $13,9 \pm 2,0$ ng/mg protein; $p < 0,05$; ileum: 5. állatcsoport: $5,7 \pm 0,5$ ng/mg protein; 6. állatcsoport: $8,6 \pm 0,7$ ng/mg protein; $p < 0,01$; colon: 5. állatcsoport: $1,5 \pm 0,2$ ng/mg protein; 6. állatcsoport: $3,0 \pm 0,3$ ng/mg protein; $p < 0,001$) (22. *ábra b, d, f*). A metánkezelt I/R-s állatcsoport mindhárom vizsgált bélszakaszában mért nitro tirozin szint megegyezett a kontroll értékekkel (22. *ábra b, d, f*).



5. EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE

5. 1. A bélfal mioelektromos aktivitásának változása az ischaemia, az ischaemia/reperfúzió, valamint a kapcsolódó metán belélegzés hatására

Mivel a bélcsatorna kontrakciós állapota térben és időben fiziológiás körülmények között is nagyon változó lehet, úgy gondoltuk, hogy az egyetlen lehetőség arra, hogy összefüggést találjunk a vérellátás kísérletes megváltoztatása és a bél motoros működésének változása között az, hogy az ischaemiás és reperfúziós inzultus során folyamatosan mérjük a bélfal kontrakcióival összefüggő mioelektromos változásokat. Ezért az Experimetria Kft. műszerfejlesztőivel együttműködve, a szakirodalomban elsőként összeállítottunk egy olyan mérőberendezést, amelynek segítségével a bélfalba erősített elektro-miográfiás szenzorokkal közvetlenül a bélfal külső izomrétegéből vezethetjük el és mérhetjük meg a kontrakciókat kísérő elektromos jeleket. Ezzel lehetőségünk nyílt arra, hogy az ischaemia és az azt követő reperfúzió, valamint az ezen inzultusokkal együtt alkalmazott normoxiás metánkeverék belélegeztetésével egy időben nyomon kövessük a bélfal domináns frekvenciájának, illetve a kontrakciók erősségének (a kontrakciók amplitúdójának) változásait. Mivel a bélcsatorna különböző szakaszaiból elvezethető elektromos jelek eltérő frekvencia értékekhez köthetők (Alvarez és Mahoney 1922; Couturier és mtsai., 1969), a munkánk során kidolgozott mérési módszer azt is lehetővé tette, hogy a bélcsatorna külső izomrétegéből elvezetett mioelektromos jeleket a vékony-, illetve a vastagbélre jellemző frekvenciatartományra szűrjük, s így különböző kísérletes feltételek között kövessük a mioelektromos aktivitás bélszakasz-specifikus különbségeit.

Bár eredményeink nagy szórása miatt a bélfal külső izomrétegéről elvezetett frekvencia- és amplitúdó értékek közötti eltérések csak néhány esetben bizonyultak statisztikailag szignifikánsnak, a mioelektromos jeleknek az egyes kísérletes állatcsoportokban az ischaemiára és az azt követő rövid ideig tartó reperfúzióra adott változásai mégis egyértelmű tendenciát mutattak.

A bélfal külső izomrétegének oxigénigénye csak mintegy negyede-harmada a nyálkahártya oxigénigényének (Walus és Jacobson., 1981), s a bélfal izomzatán átfolyó vér mennyisége is csak mintegy fele, de egyes bélszakaszokon akár csak tizede a nyálkahártyán átfolyó vérmennyiségnek (Chou és Grassmick, 1978; Gallavan és mtsai., 1980). Ezért nem meglepő, hogy a bélfal izomzata hosszan tartó ischaemiának is ellenáll. Ugyanakkor az itt bemutatott eredményeink szerint az izomkontrakciókat kísérő elektromos jelekben a rövid

ideig tartó ischaemia kezdeti szakaszán jelentős változások történtek. A kontrakciók frekvencia értékei mind a vékony- mind a vastagbélben csökkenő tendenciát mutattak, de a látványos csökkenés csak a vékonybél izomzatában bizonyult szignifikánsnak. A kontrakciók amplitúdó értékei az ischaemiás fázisban mindkét vizsgált bélszakasz izomzatában emelkedtek, de az emelkedés mértéke egyik esetben sem volt statisztikailag szignifikáns. Feltételezzük, hogy a kontrakciók frekvenciájának és amplitúdójának a megváltozása, legalábbis átmenetileg, megváltoztatja a bélcsatorna mozgásmintázatát, s a szabályos perisztaltikus kontrakciók helyett a béltartalom szegmentáló kontrakciók formájában halad végig a bélcsatornán. Ha ezek a változások enyhébb gasztrointesztinális panaszok kíséretében a mesenterialis ischaemia gyanújának esetén a klinikai gyakorlatban is észlelhetők, akkor akár egy korai terápiás beavatkozásnak is támadáspontjai lehetnek. Bár a hipoperfúzió hatására bekövetkező mioelektromos változások tendenciája a vékony- és vastagbélben megegyezett, azok időben elkülönültek. Amíg a vékonybélben az elektromos jelek változása már az ischaemia első 25 percében kimutatható volt, a vastagbélben ezek csak az ischaemia második 25 percében jelentek meg, s ez a colonnak a hipoxiával szemben mutatott nagyobb toleranciáját jelzi.

A reperfúzió kezdetén, amikor a kísérleti állataink bélmintáiból készített szövethomogenizátumokban már egyértelműen igazoltuk, hogy a reperfúziós károsodások klasszikus metabolikus útjai beindultak, a bélfalból elvezetett mioelektromos jelek frekvencia komponense az alapaktivitás értékére tért vissza. A kontrakciókat kísérő amplitúdók értékei ugyanakkor, legalábbis a vékonybélben, az alapaktivitásnál szignifikánsan alacsonyabb értéket mutattak. Ez jelzi, hogy a biokémiai markerekkel kimutatható fokozott oxidatív és nitroztatív stressz már a korai reperfúzió során is befolyásolja az izomkontrakciókat kísérő elektromos jelek egy részét, s így a korai hipoperfúzió okozta változások funkcionális szempontból csak részben reverzibilisek.

Bár az eltérő mérési technikák miatt eredményeink a korábbi irodalmi adatokkal csak óvatos összevetéseket engednek meg, megfigyeléseink megerősítik azoknak a vizsgálatoknak az eredményeit, amelyek szerint a hipoperfúzió a bél motilitásában többfázisú változást okoz. Irodalmi adatok szerint a motoros működések már néhány perces hipoperfúzió után is jellegzetes változásokat mutatnak. A vékonybél kontrakciói és a belőle elvezetett tüske potenciálok az ischaemia kezdeti szakaszán jelentősen emelkednek (Udassin és mtsai., 1995; Chou, 1982), majd az első néhány perc fokozott izomkontrakcióit hosszú nyugalmi fázis követi, amikor csak a lassú hullámok jelentkeznek (Chou, 1982). Az oxidatív és nitroztatív stressznek a bél motoros működését befolyásoló hatása csak később, a reperfúziós fázis 24.

órája körül jelentkezik látványosan, amikor a kontrakciók jelentősen csökkennek, és a tranzitidő megnő (Hierholzer és mtsai., 1999; Ballabeni és mtsai., 2002). Ezek a megfigyelések jól összeegyeztethetők a nem letális mesenterialis ischaemiát követően kialakuló, különböző súlyosságú, nehezen kezelhető motoros működési zavarokkal járó klinikai kórképekkel is (Grossie és mtsai., 2001).

Miután mi egy olyan I/R-s patkánymodellt használtunk, ahol külön tudtuk vizsgálni a rövid ideig tartó hipoperfúzió, és a korai reperfúzió hatását, megállapítottuk, hogy patkány vékonybélben az I/R hatására a bélcsatorna külső izomrétegének mioelektromos aktivitásában jelentkező zavarok szempontjából a hipoperfúzió első 25, míg vastagbélben a második 25 perce kritikus jelentőségű. A kontrakciókat kísérő frekvencia- és amplitúdó értékek ugyanis ekkor térnek el legjobban az alapaktivitáshoz, s az álműtött állatokban mért értékekhez képest. Megállapítottuk azt is, hogy ez a hatás a reperfúzió korai periódusában az izomkontrakciót kísérő frekvencia értékek szempontjából reverzibilis, míg a kontrakciókat kísérő amplitúdó értékek szempontjából irreverzibilis.

A terápiás célú metán belélegeztetés időpontját, az ischaemiás fázis utolsó 10 és a reperfúziós periódus első 5 percében, korábbi eredményeink alapján határoztuk meg. Kutatócsoportunk korábban igazolta, hogy a metánnak a nyálkahártya védelmében kifejtett hatása együtt járt a reaktív oxidatív és nitrozatív stresszmarkerek szintjének csökkentésével (Boros és mtsai., 2012). Ezért úgy gondoltuk, hogy terápiás szempontból az az időintervallum lehet a leghatékonyabb, amikor éppen elkezdődik az egyes stresszmarkerek akkumulációja. A kísérletek során alkalmazott metán belégzés egyértelműen csökkentette mind a vékonybél, mind a vastagbél domináns frekvencia értékeit, de egyik vizsgált bélszakaszban sem volt látványos hatása az izomkontrakciókat kísérő amplitúdó értékekre. Ez a megfigyelésünk részben megerősíti Pimentel és munkatársai (2006) korábbi vizsgálatait a metán tranzitidőt csökkentő hatásával kapcsolatban. A fentebb megbeszélte mérési eredményeink alapján úgy gondoljuk, hogy a hipoperfúzió azonnali hatásának kivédéséhez az ischaemiás inzultussal egy időben alkalmazott metánkezelés lenne alkalmasabb. Ennek igazolására, s egyben a metán hatásmechanizmusának pontosabb megértésére további vizsgálatok szükségesek.

5. 2. A nitrerg neuronok összneuronszámhoz viszonyított arányának változása az ischaemia, az ischaemia/reperfúzió, valamint a kapcsolódó metán belélegeztetés hatására

A ENS, s ezen belül a neurotranszmitterként NO-t használó nitrerg myentericus neuronok szelektív sérülését, s e neuronok jelentős mértékű pusztulását a mesenterialis

ischaemiát követő 24. órától a 4. hétig elhúzódó reperfúziós periódusok során már korábban bizonyították (Lindeström és Ekblad, 2004; Rivera és mtsai., 2009). Mivel a NO enzimatis úton történő szintéziséhez molekuláris oxigénre van szükség, feltételeztük, hogy a kísérletesen kiváltott hipoperfúzió korai fázisában tapasztalt mioelektromos változások szintén összefüggésben vannak a nitrerg myentericus neuronoknak a mikrokörnyezetük megváltozott oxigenizációja következtében kialakuló strukturális vagy funkcionális változásával. Mivel a bélfal izomzatának kontrakcióját kísérő elektromos jelek változása nagyon gyorsan, a kísérleteinkben alkalmazott rövid reperfúziós fázis végére „lecsengett”, feltételeztük azt is, hogy az akut hipoperfúzióra adott gyors motoros válaszok szabályozásában a nitrerg myentericus neuronok különösen nagyfokú plaszticitásának (Vannucchi és mtsai., 2002; Marletta, 1994, Sessa és mtsai., 1993; Talapka és mtsai., 2012; Bódi és mtsai., 2014) lehet meghatározó szerepe. E feltételezésünk igazolásához a nNOS-t expresszáló myentericus neuronok összneuronszámhoz viszonyított arányának bélszakasz-specifikus változását egy olyan, az előzőekben is használt patkánymodellben követtük, ahol az ischaemiás és reperfúziós inzultusok következményeit egymástól függetlenül tudtuk vizsgálni. A kvantitatív immunhisztokémiai vizsgálataink eredményei alapján megállapítottuk, hogy a nitrerg myentericus neuronok a különböző bélszakaszokon mind a hipoperfúzióra, mind a korai reperfúzióra különbözőképpen reagáltak. Megállapítottuk azt is, hogy nem csak a nitrerg neuronok összneuronszámhoz viszonyított aránya, de a kvantitatív változások dinamikája is különbözött az egyes bélszakaszokon.

Hipoperfúzió során a nNOS-t expresszáló neuronok aránya mind a duodenumban, mind az ileumban lecsökkent. Bár a csökkenés mértéke a duodenumban kisebb volt (5%), mint az ileumban (10%), az ischaemia során alkalmazott metán belégzést követően a duodenumban ez a lecsökkent nitrerg neuron arány stabilizálódott, míg az ileumban metánkezelés után a nitrerg neuronok denzitása nőtt, s így a metán kedvező hatásának köszönhetően ezen a bélszakaszon már az ischaemiás perióduson belül helyre állt az eredeti nitrerg neuron arány. A duodenumban a nitrerg neuronok eredeti aránya a reoxigenizáció után sem tért vissza, megmaradt az ischaemiás inzultus során lecsökkent denzitás érték. Az ileumban azonban reperfúzió után a nitrerg neuronok aránya meghaladta a kontroll minták denzitás értékeit. Amikor a reoxigenizációhoz metán belélegeztetés is kapcsolódott, a nitrerg neuronok aránya mindkét bélszakaszon a kontrollhoz közeli értékekre tért vissza. Ez arra utal, hogy metán belégzés után a nitrerg neuronok mindkét bélszakaszban képesek voltak alkalmazkodni mikrokörnyezetük megváltozott oxigén szintjéhez. Az eredeti nitrerg neurondenzitás helyreállításához azonban a két bélszakaszban lévő nitrerg myentericus

neuronoknak két különböző adaptációs stratégiát kellett követniük. A kontrollnak megfelelő értékek eléréséhez a duodenumban növelni kellett az ischaemiás fázisban lecsökkent neurondenzitást, míg az ileumban csökkenteni kellett a reperfúziós fázisban megemelkedett neuronok számát.

Mivel a kísérleteinknél alkalmazott rövid ischaemiás és reperfúziós inzultusok során a colonban sem a bélfal simaizom kontrakcióit kísérő elektromos jelek kvantitatív sajátosságai, sem az oxidatív és nitroztatív stresszmarkerek szintje nem változott jelentősen, az sem volt meglepő, hogy itt a nitrerg neuronok aránya is csak kisebb eltéréseket mutatott. Az ischaemiás inzultus ugyan egy átmeneti növekedést eredményezett a nitrerg neuronok arányában, de ez mind az ischaemiás periódusban alkalmazott metánkezelés, mind a reoxigenizáció során teljes mértékben reverzibilisnek bizonyult. Ezek az eredmények tovább erősítik azt a feltételezést, hogy a colon a másik két vizsgált bélszakasznál sokkal jobban tolerálja a vérátfolyás különbözőségeit.

Kvantitatív immunhisztokémiai vizsgálataink eredményeit összevetve azokkal az irodalmi adatokkal, amelyek egyrészt a hipoperfúzióra adott azonnali paradox motoros válaszokra (Udassin és mtsai., 1995; Walus és Jacobson, 1981; Calcina és mtsai., 2005), másrészt a nitrerg myentericus neuronoknak a késői reperfúzió során leírt pusztulására vonatkoznak (Rivera és mtsai., 2011; Rivera és mtsai., 2009), feltételezzük, hogy a nitrerg myentericus neuronok az oxigén elvonásra, s az azt követő reoxigenizációra két fázisban reagálnak. Az első fázisban reverzibilis, adaptív változások történnek. Ameddig az „adaptációs ablak” nyitva van, különböző, magukon a neuronokon belül működő reverzibilis metabolikus változások koordinálják a nitrerg neuronok alkalmazkodását a hipoperfúzió vagy reperfúzió miatt kialakult extrém környezeti feltételekhez. Bár tudjuk azt, hogy a 120 perces reperfúziós fázis során már elkezdődik az oxidatív és nitroztatív stresszmarkerek felhalmozódása, eredményeink azt sugallják, hogy ebben az időszakban az oxidatív és nitroztatív stressz szintje még nem érte el azt a kritikus szintet, amely a myentericus nitrerg neuronok irreverzibilis megváltozását okozná, vagyis a nitrerg neuronok „adaptációs ablaka” ekkor még nyitva van. Ezért képesek még a reperfúziós fázison belül is reagálni olyan terápiás beavatkozásokra is, amelyeket pl. esetünkben a metán képes közvetíteni. S így, mint ahogy a duodenum és az ileum esetében láttuk, akár két ellentétes irányú adaptációs stratégiával, a neuronális denzitás növelésével és csökkentésével is képesek helyreállítani az eredeti nitrerg neuron arányt mindkét bélszakaszon. Tekintve az itt bemutatott immunhisztokémiai eredményeinket feltételezzük, hogy a nitrerg myentericus neuronok adaptációjának első fázisa együtt jár azzal, hogy a myentericus neuronok nNOS tartalma dinamikusan változik. Az

átmeneti növekedés, csökkenés, majd az eredeti szintre való visszatérés anélkül következik be, hogy közben a myentericus összneuronszám változna, vagyis számottevő neuronpusztulás lenne. A nNOS utak – a bevezetőben már részletezett – extenzív plaszticitása (Vannucchi és mtsai., 2002; Marletta, 1994; Sessa és mtsai., 1993; Talapka és mtsai., 2012; Bódi és mtsai., 2014) támogatja ezt a dinamikát. Irodalmi adatok utalnak arra is, hogy az ilyenfajta adaptív válaszok nem kizárólag extrém oxigenizációs viszonyok között érvényesülhetnek, hanem általában jellemzik a nNOS neuronok patológiás mikrokörnyezetre adott válaszait (Cellek és mtsai., 2003; Cellek és mtsai., 2005). Ezeknek a korai adaptációs folyamatoknak további vizsgálata, s azok jobb megismerése lehetőséget adhat az adaptációs fázis kiterjesztésére, s így hatékony terápiás eljárások kidolgozására.

Irodalmi adatokból ismert, hogy az elhúzódó reperfúziós fázis során a nNOS-t expresszáló neuronok átlépnek egy második reaktív fázisba, amikor már visszafordíthatatlan strukturális és metabolikus változások történnek bennük, s végül jelentős számban elpusztulnak (Walus és Jacobson, 1981; Calcina és mtsai., 2005; Rivera és mtsai., 2011). Mivel a nNOS-t expresszáló myentericus neuronokban termelődő NO meghatározó szerepet játszik a bél simaizomzatának nem-adrenerg, nem-cholinerg relaxációjában, s ezen keresztül a bélperisztaltika szabályozásában (Mizuta és mtsai., 1999), e neuronok pusztulása súlyos bélmotilitási problémákhoz vezethet. Valószínűleg a nitrerg neuronok szelektív sérülése lehet a háttérben az olyan súlyos klinikai kórképeknek is, mint például a bél diszmotilitási szindróma. Ez igen gyakran alakul ki azoknál a betegeknél, akik hetekkel korábban nem letális mesenterialis ischaemián estek át (Grossie és mtsai., 2001).

5. 3. Oxidatív és nitrozatív stresszmarkerek szintjének változása az ischaemia, az ischaemia/reperfúzió, valamint a kapcsolódó metán belélegzés hatására

Az emlősállatok bélcsatornája a reaktív oxigén és nitrogén származékok képződésének egyik jelentős területe. Ezek mindegyike biológiailag aktív molekula, s reakcióik során képesek befolyásolni a legkülönbözőbb fiziológias és patológiás folyamatokat akár lokálisan magában a bélcsatornában, akár felszívódásuk után szisztémásan. A különböző szabadgyökök szerepe a bélcsatornában, s különösen a bélnyálkahártya I/R-s károsodásában széleskörűen bizonyított (Perry és mtsai., 1986; Itoh és Guth, 1985; Parks és mtsai., 1983). Az egyes reaktív molekulák szöveti vagy a vérszérumban meghatározott szintje a károsodások mértékét jelzi, s így ezek meghatározása fontos kiindulópont az I/R-t követő patológiás folyamatok diagnózisában és a terápiás lehetőségek kijelölésében. Az oxidatív és nitrozatív stressznek a

bél motoros működését befolyásoló hatása azonban csak a reperfúzió késői szakaszában jelentkezik látványosan. Vizsgálataink során mi arra voltunk kíváncsiak, hogy a vérátfolyás kísérletes megváltoztatásával kialakuló akut mesenterialis ischaemia és az ezt követő reperfúzió korai fázisa okoz-e a stresszmarkerek szintjében olyan bélszakasz-specifikus változásokat, amelyek magyarázatul szolgálhatnak a bélfalból elvezetett mioelektromos jelek korábban tárgyalt változásaira vagy a nitrerg neuronok adaptív folyamataira. Kísérleteink során a három, korábban is vizsgált bélszakaszból, a duodenumból, ileumból és colonból nyert szövethomogenizátumokban az ischaemia és az ischaemiát követő reperfúzió, valamint a kapcsolódó metán belégzés hatását vizsgáltuk az oxidatív stressz kialakulásában kulcsszerepet játszó XOR és a leukocita infiltráció mértékét jelző MPO aktivitására, a szöveti nitrit/nitrát mennyiségének meghatározásával követtük a NO termelődés változását, míg a szöveti nitro tirozin szint meghatározásával a nitroztív stressz szintjét jellemeztük.

Kísérletes adatok bizonyítják, hogy az endogén XOR tartalomban mért bélszakasz-specifikus különbségek alapvetően meghatározzák egy-egy bélszakasz I/R-s érzékenységét (Perry és mtsai., 1986; Leung és mtsai., 1992). Mi az álműtött patkányok duodenális mintáiban ötször magasabb XOR aktivitást mértünk, mint azok ileális mintáiban, míg a colonban a duodenumban meghatározott enzimaktivitás értékeknek csak huszadát detektáltuk. A XOR aktivitásában az AMS elszorítását követően egyik bélszakaszon sem találtunk szignifikáns különbséget a kontroll minták XOR aktivitás szintjéhez képest. Ugyanakkor a leukociták aktivációját jelző MPO aktivitás a duodenális mintákban szignifikánsan megemelkedett, s ezen a megemelkedett szinten maradt akkor is, amikor az ischaemiás inzultushoz metán belégzés is kapcsolódott. Úgy gondoljuk, hogy a duodenumban az ischaemiás inzultus során megemelkedett MPO aktivitás összefüggésben van a duodenum magasabb XOR szintjével, ami ezt a bélszakaszt alapvetően érzékenyebbé teszi az ischaemiás károsodásokra. Ez egyben magyarázatot ad az ileum és a duodenum között, a nitrerg neuronok adaptációs mechanizmusában megfigyelt különbségekre is. A reperfúzió során mind a XOR, mind az MPO aktivitása mindhárom vizsgált bélszakaszban fokozódott, ami arra utal, hogy az irodalmi adatoknak megfelelően (Kuwabara és mtsai., 2003) a reperfúziós károsodások klasszikus metabolikus útjai beindultak, a XOR működése megváltozott, s a ROS termelődése fokozódott. Majd, amikor a reoxigenizációhoz metán belégzés is kapcsolódott, az irodalmi előzményeknek (Kaszaki és mtsai., 2013; Boros és mtsai., 2012) megfelelően mindkét enzim szintje mindhárom vizsgált bélszakaszon a kontroll szintre csökkent. Ezek az eredmények a metán védő hatásának azt a hipotézisét támasztják alá, mely szerint a metán képes átmenetileg felhalmozódni a sejtek membránjában s így képes

befolyásolni több más membránkött fehérje mellett a XOR aktivitását is (Varga és mtsai., 2012).

A NO termelés szabályozása a sejtek oxidatív stressz ellen alkalmazott legfontosabb védekező mechanizmusa. A NO csapdázza az oxigén szabadgyököket, csökkenti a leukociták mesenterialis erek endotheliumához történő kitapadását és elősegíti az erek permeabilitásának fenntartását (Wink és mtsai., 1998; Lefer és Lefer 1996). Ugyanakkor a reperfúzió korai fázisában a $O_2^{\bullet-}$ megemelkedett szintje korlátozza a NO akkumulációját, s így megakadályozza a NO kedvező, védő hatásainak érvényesülését (Gauthier és mtsai., 1994). Miután a NO termelés szorosan függ a környezet oxigén tenziójától, a neuronok alkalmazkodása az ischaemia vagy a reperfúzió következtében kialakuló extrém környezeti feltételekhez nagymértékben függ a neuronok bélcsatornában elfoglalt helyétől. Ezt tükrözik az előbbieken már megbeszélte, nNOS-t expresszáló myentericus neuronoknak az ischaemiára és a korai reperfúzióra adott bélszakasz-specifikus adaptációs folyamatai.

A NO aktuális szintjének meghatározása diagnosztikus jelentőségű, ugyanakkor nagy reakciókészsége és diffúzibilis természete miatt a szövetekből nehezen kimutatható. Kimutatására a stabil oxidált termékeinek, a nitrit/nitrát szintnek meghatározása az egyik legelfogadottabb módszer (Weitzberg és mtsai., 2010; Lundberg és Weitzberg, 2013). Az endogén nitrit/nitrát szint meghatározása ugyanakkor a szövetekben raktározott NO szintjéről, s így a szövetek ischaemia toleranciájáról is felvilágosítást adhat. Oxigénszegény környezetben a NO ezekből a szöveti raktárakból felszabadítható (Lundberg és mtsai., 2008), így az ischaemia következtében kialakuló citotoxikus folyamatokkal szemben akár teljes anoxiás állapotban is érvényesülhet a NO kedvező, sejtvédő hatása. Vizsgálataink során az álműtött állatok vékonybelének két szakasza között jelentős különbséget találtunk a szöveti nitrit és nitrát szintjében. A duodenumban csak közel feleannyit mértünk, mint az ileumban és a colonban. Hipoperfúzió során csak az ileális mintákban emelkedett meg szignifikánsan a szöveti nitrit és nitrát szint, míg a korai reperfúzió során mindhárom vizsgált bélszakaszban a kontroll mintákéhoz hasonló értékeket kaptunk. Ez alapján feltételezzük, hogy a mi kísérleti körülményeink között a NO még megfelelő, fiziológiához közeli mennyiségben van jelen, de mindenképp elegendő mennyiségben ahhoz, hogy a nitreg neuronok „adaptációs ablaka” nyitva maradjon, s így képesek legyenek alkalmazkodni akár az ischaemia, akár a reoxigenizáció okozta megváltozott környezeti feltételekhez. Ugyanakkor az ileum megemelkedett nitrit/nitrát szintje magyarázatot adhat a nNOS-t expresszáló myentericus neuronoknak a duodenumban és az ileumban megfigyelt eltérő adaptációs dinamikájának megértéséhez.

A NO károsító hatása a ROS-kal történő reakciója során keletkező reaktív nitrogén származékok, például az aminosavak tirozin oldalláncát nitroziláló peroxinitrit révén valósul meg. A szöveti nitrozatív stressz monitorozására ezért a peroxinitritnek a tirozin oldalláncokkal alkotott termékét, a nitrotirozin szintjének az ischaemia és az I/R alatt bekövetkező változását határoztuk meg. Az álműtött állatok szöveti nitrotirozin szintjében jelentős bélszakasz-specifikus különbségeket találtunk. A legmagasabb nitrotirozin szintet a duodenumban mértük. Az ileumban a duodenumban mért érték kétharmada, míg a colonban annak negyede volt jellemző. Az ischaemiás inzultus során a vékonybélben csak a duodenumban találtunk jelentős emelkedést a nitrotirozin szintjében. Ez megint csak azt jelzi, hogy a duodenum képes legkevésbé tolerálni a környezet megváltozott oxigén tenzióját. Ugyanakkor magyarázatul szolgálhat arra a fentebb már megbeszélt eredményünkre, hogy az itt talált nNOS-t expresszáló myentericus neuronok lassabban alkalmazkodnak az ischaemia okozta megváltozott környezeti feltételekhez. A korai reperfúzió során mindhárom vizsgált bélszakaszban szignifikánsan megemelkedett a nitrotirozin koncentráció, jelezve, hogy ebben a fázisban már a NO szövetkárosító hatása kerül előtérbe, a ROS-kal reagálva fokozódik a peroxinitrit képződése (Rivera és mtsai., 2011). A reperfúziós fázisban alkalmazott metánbelégzés mindhárom vizsgált bélszakaszban az álműtött állatokból származó mintákban mért értékekhez közeli értékeket mutatta. Ez a metán védő hatásának másik hipotézisét támasztja alá, miszerint a metán a nitrozatív stressz mértékét a NO redukív származékainak csökkentése útján képes redukálni (Varga és mtsai., 2012).

5. 4. Az exogén metán, mint terápiás lehetőség a mesenterialis ischaemiás és ischaemia/reperfúziós sérülések kivédésére

Az elmúlt évtizedekben egyre több gáz halmazállapotú molekuláról, többek között a NO-ról, szén-monoxidról vagy kén-hidrogénről derült ki az, hogy különböző biológiai rendszerekben meghatározó szerepet játszanak, s így terápiás célú felhasználásuk lehetősége is felmerült (Kajimura és mtsai., 2010). A metán biológiai aktivitásának az orvosi gyakorlatban való hasznosítási lehetősége sem új keletű dolog. Állatkísérletekben már korábban igazolták, hogy az endogén metán képes lassítani a bél tranzitidejét (Pimentel és mtsai., 2006) vagy csökkenteni a perisztaltikát (Jhang és mtsai., 2011). Munkacsoportunk korábban a metán exogén alkalmazásának lehetőségét vizsgálva kimutatta, hogy 2,5% metánt tartalmazó normoxiás levegőkeverék 3 órán át tartó belélegzése a patkányok vérgáz értékeiben és keringési dinamikájában nem okozott szignifikáns eltéréseket (Boros és mtsai.,

2012). Ugyanebben a munkában igazoltuk azt is, hogy I/R inzultussal együtt alkalmazott metánbelégzés kutyában csökkentette az oxidatív és nitroztív stresszmarkerek szintjét, s jelentős mértékben kivédte a bélnyálkahártya I/R okozta szöveti sérülését. Disszertációmban az ischaemiás és reperfüziós fázisban alkalmazott metánkezelések után kapott eredményeink azt bizonyítják, hogy az ischaemiás és reperfüziós inzultusok során alkalmazott metán belélegeztetés nem csak a bélnyálkahártyát, de a bélfal izomzatát és az entericus neuronokat is megvédi az oxidatív és nitroztív stressz következményeitől. Az ischaemiás inzultus során alkalmazott 2,2%-os normoxiás metánkeverék belélegeztetése bélszakasztól függően növelte, csökkentette vagy éppen az ischaemiás állapot szintjén tartotta a nNOS-t expresszáló myentericus neuronok arányát. Ha azonban a metán belélegeztetést a reperfüziós periódus kezdetén is folytattuk, a reperfüzió során képződő ROS szintjét a metán belélegzés minden bélszakaszban a kontrollhoz közeli szintre csökkentette. A reoxigenizációs fázis során alkalmazott metánbelégzés után a nNOS-t expresszáló neuronok aránya is minden bélszakaszon kontroll körüli értéken volt. Kijelenthetjük, hogy az exogén metán meghatározó szerepet játszik abban, hogy a nNOS-t expresszáló neuronok képesek legyenek alkalmazkodni a reoxigenizáció miatt megváltozott szöveti mikrokörnyezethez.

A fokozott oxidatív stressz mára a legtöbb humán betegség hátterében kimutatható. Ugyanakkor a napjainkban alkalmazott antioxidánsok csak korlátozott mértékben jutnak át a sejtmembránokon, így terápiás hatékonyságuk rendkívül csekély (Smith és Murphy, 2011). A gáz halmazállapotú metán ugyanakkor könnyen bejuthat a sejtmagba vagy a mitokondriumokba, s így képes megvédeni akár a nukleáris, akár a mitokondriális DNS-t az oxidatív stressz okozta sérülésekkel szemben.

A metángáz biológiai hatását azonban eddig csak jelenség szintjén sikerült igazolnunk. Terápiás célú felhasználása előtt pontosan meg kell ismernünk azokat a molekuláris mechanizmusokat, amelyek a védőhatás hátterében húzódnak. Meg kell határozni a metán védő hatásának eléréséhez szükséges minimális dózis értékét. Mivel az eddigi kísérletek alapján úgy tűnik, hogy a hatékony dózis nagyságrendekkel nagyobb, mint az endogén úton keletkező metán mennyisége (átlagosan 14,8 ppm; Bond és mtsai., 1971), meg kell tudnunk azt is, hogy az exogén metán alkalmazása hogyan befolyásolja az endogén metántermelést, s ezen keresztül a bélflóra összetételét. A metán előnyös tulajdonságai közé sorolható, hogy a földgáz fő összetevőjeként könnyen hozzáférhető, s a belélegzett metán gyors hatása miatt nagyon alkalmas lehet az akut oxidatív és nitroztív stressz kivédésére. Hátránya azonban, hogy erősen gyúlékony. Ezért terápiás célú alkalmazásának alternatív lehetősége lehet a nagy nyomáson történő fizikai oldása, majd a „metán-gazdag” fiziológiás folyadék intraperitonealis

alkalmazása (Ye és mtsai., 2015; Song és mtsai., 2015). Végül figyelembe kell venni azt is, hogy a terápiásan alkalmazott metán nagy része a bőrön vagy tüdőn keresztül változatlan formában távozik a szervezetből. Miután a metán üvegházhatású gáz, ha a belélegeztetése a rendszeresen alkalmazott orvosi eljárások közé kerül, szükségessé válik az újrahasznosítás kérdésének megoldása is.

5. 5. Következtetések

Eredményeink választ adnak a célkitűzésekben feltett kérdéseinkre.

Igazoltuk, hogy az akut oxigénhiány a bélcsatorna teljes hosszában megváltoztatja a simaizom kontrakciókat kísérő mioelektromos jelek frekvencia- és amplitúdó értékeit. A reoxigenizáció során a bélfalizomzat kontrakcióit kísérő frekvencia értékek az alapaktivitáshoz közeli értékeket mutatnak, de a kontrakciók amplitúdó értékei az alapaktivitáshoz képest lecsökkennek. Így a hipoxia okozta funkcionális változások csak részben reverzibilisek.

Kísérleti eredményeink bizonyítják azt, hogy a nitrerg myentericus neuronok kvantitatív sajátosságai az ischaemiás és reperfúziós inzultus során bélszakasz-specifikusan változnak.

Kvantitatív immunhisztokémiai vizsgálataink eredményeit az irodalmi adatokkal összevetve megállapítottuk, hogy hasonlóan más patológiás körülményekhez a nitrerg myentericus neuronok az oxigén elvonásra, s az azt követő reoxigenizációra két fázisban reagálnak. Az első fázisban reverzibilis, adaptív változások történnek, amikor a nitrerg neuronok nNOS tartalma dinamikusan változik, de számottevő sejtpusztulás nincs. A reperfúzió késői szakaszában bekövetkező irreverzibilis változások azután a nitrerg neuronok szelektív pusztulásához vezetnek.

Megállapítottuk azt, hogy a duodenum endogén XOR szintje mintegy ötszöröse az ileuménak. Mivel a XOR az oxidatív és nitrozatív stresszreakciók kulcsenzime, a XOR fiziológiai szintjében talált jelentős eltérés önmagában is magyarázatul szolgálhat az I/R során megfigyelt funkcionális, strukturális és molekuláris válaszok bélszakasz-specifitására.

Mivel a korai reperfúzió során a bélfal aktuális NO szintje mindhárom vizsgált bélszakaszon kontrollhoz közeli értéket mutatott, megállapítottuk, hogy a bélcsatorna endogén NO szintje elegendő ahhoz, hogy a nitrerg myentericus neuronok képesek legyenek alkalmazkodni a környezet megváltozott oxigenizációs szintjéhez, akár az ischaemiás, akár a korai reperfúziós fázis során.

Bizonyítottuk azt, hogy az ischaemiás és reperfúziós inzultusok során alkalmazott exogén metán kontroll szintre csökkenti a reperfúzió során megemelkedett oxidatív és nitrozatív stresszmarkerek szintjét. Úgy gondoljuk, hogy metán belélegeztetés után ennek következményeként áll helyre az ischaemia során megváltozott mioelektromos aktivitás, és tér vissza a nitrerg myentericus neuronok eredeti denzitása.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

6. 1. Magyar nyelvű összefoglalás

Az akut mesenterialis ischaemia a bélcsatornát ellátó erek elzáródása vagy csökkent véráramlása következtében a bélfal elégtelen vérellátását, s az ennek eredményeként kialakuló oxigénhiányos állapotát jelenti. Az emlős bélcsatorna ereinek nagyfokú kollateralizációja és az ezzel járó kompenzációs mechanizmusok miatt a bélfal a hosszabb idejű hipoperfúziót is jól tolerálja. A véráramlás hosszabb idejű megszűnése vagy erőteljes csökkenése azonban súlyos funkcionális, strukturális és molekuláris zavarok kialakulásához vezet. Az akut mesenterialis ischaemia korai tünetei a kompenzációs mechanizmusok miatt nehezen ismerhetők fel, s legtöbbször csak akkor diagnosztizálható, amikor a szöveti sérülések már visszafordíthatatlanok.

Az ischaemia/reperfúziós (I/R) károsodások a reperfúzió késői időszakában jól ismertek. Arról azonban, hogy a már súlyos funkcionális zavarokat is okozó szövettani elváltozásokat megelőzően az ischaemia alatt, illetve a reperfúzió korai szakaszában milyen strukturális, funkcionális vagy molekuláris változások történnek a bélfalban, szinte semmit sem tudunk. Munkánk során ezért olyan patkánymodellt használtunk, ami lehetővé tette, hogy a bélcsatorna motoros működésének, a nitrerg neuronok kvantitatív sajátosságainak és az oxidatív és nitrozatív stressz markerek szöveti szintjének változását az ischaemia ideje alatt, illetve az ischaemiát követő reperfúzió korai fázisában külön vizsgáljuk. Kutatócsoportunk korábban már bizonyította, hogy a metán belélegzés csökkenti a mesenterialis I/R következtében kialakuló gyulladásos folyamatokat. Ezért kíváncsiak voltunk arra is, hogy a metán belélegzés kivédi-e a vizsgált paramétereknek az ischaemia, illetve az I/R okozta változásait.

Kísérleti állatainkat ennek megfelelően négy rövid (álmműtött, ischaemiás, metánkezelt álmműtött és metánkezelt ischaemiás) és négy hosszú (álmműtött, I/R-s, metánkezelt álmműtött és metánkezelt I/R-s) vizsgálati idejű csoportra osztottuk. Annak megválaszolására, hogy a vizsgált paraméterek ischaemiás és I/R-s váltoásaiban vannak-e bélszakasz-specifikus eltérések, munkánk során a duodenumból, az ileumból és a colonból származó szövetmintákat is megvizsgáltuk.

A különböző kísérleti körülmények hatására a bélcsatorna motoros aktivitásában bekövetkező változások vizsgálatára a bélfal külső izomrétegéből mioelektromos jeleket vezettünk el, melyeket a vékony- és vastagbélre jellemző frekvenciatartományokra szűrtünk meg. Ezt

követően gyors Fourier-transzformációval a kontrakciók gyakoriságának jellemzésére a domináns frekvencia értékeket, a kontrakciók nagyságának megállapításához az ahhoz tartozó power spektrum denzitás (power spectrum density, PSD) értékeket határoztuk meg.

Bélnyúzat preparátumokon a myentericus összneuronszám megállapításához HuC/HuD pán-neuronális marker, míg a myentericus nitrerg neuronok kvantitatív változásainak vizsgálatára neuronális nitrogén-monoxid szintáz ellen termeltetett elsődleges antitestek segítségével immunhisztokémiai festést végeztünk, majd megszámoltuk az egy látótérre eső immunpozitív sejtek számát. A nitrerg neuronok arányát az összneuronszámhoz viszonyítva adtuk meg.

A vizsgált bélszakaszok oxidatív stressz szintjének a különböző kísérleti körülmények között bekövetkező változásait a szöveti xantin oxidoreduktáz (XOR) aktivitásának mérésével jellemeztük. A bélfal leukocita infiltrációjának mértékében bekövetkező változások megállapításra a szöveti mieloperoxidáz (MPO) enzim aktivitását határoztuk meg. A szöveti nitrogén monoxid (NO) szint változásait a szöveti nitrit/nitrát szint meghatározásával követtük nyomon. A vizsgált bélszakaszok nitroztatív stressz szintjének változásait a szöveti nitro tirozin szint mérésével jellemeztük.

Kimutattuk, hogy ischaemia hatására a vékony- és a vastagbél falában mért frekvencia értékek csökkentek, s ezzel egy időben a PSD értékek nőttek. A reoxigenizáció során a bélfal izomzat kontrakcióinak frekvencia értékei az alapaktivitáshoz közeli értéket mutattak, de a PSD értékek az alapaktivitáshoz képest csökkentek, azaz a hipoxia okozta funkcionális változások csak részben voltak reverzibilisek. Ez arra utal, hogy a reperfúzió korai fázisában az oxidatív és nitroztatív stressz szintjének emelkedése kedvezőtlenül befolyásolja a funkcionális paramétereket. Megállapítottuk azt is, hogy a vastagbél az ischaemia és a reperfúzió kiváltására később reagált a vékonybélnél, ami a vastagbél hipoxiával szemben mutatott nagyobb ellenálló képességét jelzi.

A nitrerg neuronok összneuronszámhoz viszonyított aránya ischaemia hatására mind a duodenumban, mind az ileumban szignifikánsan a kontroll érték alá csökkent. A metán belélegzés a duodenumban nem, de az ileumban visszaállította a nitrerg neuronok kontrollhoz közeli arányát. A reperfúziót követően a duodenális mintákban szignifikánsan alacsonyabb, míg az ileális mintákban szignifikánsan magasabb volt a nitrerg neuronok aránya a kontroll értékekhez képest. Az I/R-hoz kapcsolódó metán belélegzés hatására a nitrerg neuronok aránya a vékonybél mindkét vizsgált szakaszában a kontrollhoz közeli értékre állt vissza. Eredményeinket irodalmi adatokkal összevetve feltételezzük, hogy a nitrerg neuronok a reperfúzió késői fázisában korábban már megfigyelt szelektív pusztulását egy korai, adaptív fázis előzi meg, így a nitrerg neuronok az oxigén elvonásra, s az azt követő reoxigenizációra

két fázisban reagálnak. Az első fázisban, az ischaemia és a reperfúzió korai fázisa alatt azok reverzibilis, adaptív változásokon mennek keresztül, ez a nitrerg neuronok nNOS tartalmának dinamikus változásával jár. Az elhúzódó reperfúziós fázis során a nitrerg neuronok átlépnek egy második reaktív fázisba, amikor már visszafordíthatatlan strukturális és metabolikus változások történnek bennük, s végül jelentős számban elpusztulnak.

Az oxidatív és nitrozatív stresszmarkerek szintje a vizsgált bélszakaszokban fiziológiás körülmények között jelentős eltéréseket mutatott. A XOR és MPO aktivitása, valamint a szöveti nitro tirozin szint a reperfúzió korai szakaszában minden bélszakaszban szignifikánsan magasabb volt a fiziológiás értékeknél. Metán belélegzés után minden esetben kontrollhoz közeli értéket kaptunk. A szöveti nitrit/nitrát szint a hipoperfúzió során csak az ileumban emelkedett szignifikánsan. Az ileum emelkedett nitrit/nitrát szintje szerepet játszhat abban, hogy ebben a bélszakaszban már az ischaemiás periódusban alkalmazott metán belélegzés is jótékony hatást gyakorolt a nitrerg neuronok adaptív változásaira.

Bár a metán pontos hatásmechanizmusát nem ismerjük, az, hogy a reperfúzióhoz kapcsolt metán belélegzés után az oxidatív és nitrozatív stresszmarkerek szintje a kontroll értékekhez közeli szintre csökken, a metán hatásmechanizmusának két lehetséges elméletét is alátámasztja. Az egyik szerint a metán képes közvetlenül csökkenteni a XOR által termelt reaktív oxigén származékok szintjét. A másik elmélet szerint a metán a NO redukív származékainak szintjét csökkentve képes mérsékelni az I/R-s nitrozatív stressz mértékét.

Eredményeink választ adtak a célkitűzéseinkben feltett kérdéseinkre. Igazoltuk, hogy a bélcsatorna mioelektromos aktivitása ischaemia és reperfúzió alatt részben reverzibilisen változik. Kimutattuk, hogy az ischaemia és az azt követő reperfúzió korai fázisa alatt a különböző bélszakaszokban talált nitrerg neuronok kvantitatív sajátosságai eltérő módon változnak. A bélszakasz-specifikus változások hátterében az oxidatív és nitrozatív stressz bélszakaszonként eltérő mértéke állhat. Igazoltuk, hogy az ischaemiás fázis végén és a reperfúziós periódus elején belélegzett metán az oxidatív és nitrozatív stresszmarkerek csökkentésével nemcsak a bél nyálkahártyát, de a bél fal izomzatát és az entericus neuronokat is megvédi a hipoxia és reoxigenizáció káros következményeitől.

6. 2. Summary

Acute mesenteric ischemia occurs when mesenteric arteries are occluded or the blood flow is reduced which leads to inadequate oxygen levels and formation of hypoxia in the gut wall. Due to the compensatory mechanisms and the extensive collateral network of arterioles the gut wall can tolerate longer hypoperfusion to some extent. However, loss of mesenteric blood flow for longer period leads to formation of severe functional, structural and molecular disorders. Because of the compensatory mechanisms of arterioles, symptoms of the acute mesenteric ischemia are non-specific, and its diagnosis is often possible only after formation of irreversible functional, structural and molecular changes.

The late phase damages caused by ischemia/reperfusion (I/R) are well known, however little is known about the structural, functional and molecular changes during ischemia or early stages of reperfusion. Therefore, we established a rat model in which we were able to investigate the changes in intestinal motility, in the quantitative parameters of myenteric nitrergic neurons and in the levels of oxidative and nitrosative stress markers caused by ischemia and I/R, separately. We have recently demonstrated the anti-inflammatory effects of inhaled methane on mesenteric I/R, so that in this study we also investigated if inhaled methane can prevent the structural, functional and molecular changes caused by ischemia and I/R.

Animals were divided into four short term (sham-operated, ischemic, methane-treated sham-operated and methane-treated ischemic) and four long term (sham-operated, I/R, methane-treated sham-operated and methane-treated I/R) experimental groups. To answer the question if there are any differences in the values of these parameters between the different intestinal segments we collected and examined samples from the duodenum, the ileum and the colon.

To study the changes in the motoric activity of gut wall, myoelectric signals were recorded from the outer smooth muscle layer of the intestine. Recordings were filtered via their frequency ranges into the signals originated from the small or the large intestine, then were analysed with fast Fourier-transformation. We analysed the dominant frequency of the contractions and to characterize the amplitude of contractions, we calculated the power spectrum density (PSD) of dominant frequency ranges as well.

To measure the quantitative properties of myenteric neurons, total myenteric neuronal number was calculated by using HuC/HuD immunohistochemistry as pan-neuronal marker on whole-

mount preparations. To study the quantitative parameters of nitrergic myenteric neurons the number of nNOS-immunopositive neurons was counted. After counting each immunoreactive neurons per field of view, the proportion of nitrergic myenteric neurons was calculated.

For monitoring the oxidative stress we measured the activity of xanthine oxidoreductase (XOR) which has a key role in generating reactive oxygen species. We also studied the levels of infiltrated leukocytes by measuring the activity of myeloperoxidase (MPO) which is released from the activated leukocytes congregating in the gut wall. As the stable end product of nitric oxide (NO) oxidation, levels of nitrite and nitrate were measured to monitor the levels of tissue NO. To determine the nitrosative stress levels we measured the tissue levels of nitrotyrosine.

After the occlusion of the mesenteric superior artery, the frequency values decreased, while the PSD values increased in both the small and large intestine. At the beginning of the reperfusion state, frequency values returned to near the baseline levels, but the PSD values stayed at significantly lower level. This suggests that the changes in the mioelectric activity of the gut are partly affected by the increased levels of oxidative and nitrosative stress during ischemia, therefore this proces is partly reversible. Responses to the induction of ischemia or reperfusion appeared later in the colon than in the small intestine which suggest that the colon has greater resistance to hypoxia.

After ischemia, the proportion of nitrergic myenteric neurons decreased significantly both in the duodenal and ileal samples. After methane inhalation, proportion of nitrergic neurons reached control level in the ileum but not in the duodenum. In the early reperfusion, proportion of nitrergic neurons compared to control values was significantly lower in the duodenal and significantly higher in the ileal samples, and these values reached control levels in both small intestinal segments when methane inhalation was linked to reperfusion.

Our results in accordance with the literature suggest that nitrergic neurons react to ischemic and reperfusion insults in two phases. Before the selective loss of nitrergic neurons at the late phase of reperfusion there is an adaptive phase during ischemia and early reperfusion when nitrergic neurons undergo adaptive changes which are associated with the dynamic changes of nNOS content of nitrergic neurons. In the second phase, at the late phase of reperfusion, selective loss of nitrergic neurons occurs.

In physiological conditions, there were notable differences in the levels of oxidative and nitrosative stress markers between the intestinal segments. Activity of XOR and MPO and the levels of nitrotyrosine increased significantly after reperfusion in each intestinal segment. When methane inhalation was linked to reperfusion, all of these biochemical values reached

control levels. Tissue nitrite and nitrate levels increased significantly only in the ileal samples after ischemia. The increased levels of nitrite and nitrate in the ileum can support the protective role of methane inhalation on nitrergic myenteric neuronal adaptation.

Although the mechanism of action of methane is not known yet, the fact that when reperfusion was linked to methane inhalation the values of oxidative and nitrosative stress markers decreased to control levels, supports two possible explanations. In one theory methane is able to decrease the production of reactive oxygen species via direct interaction with XOR enzyme. In the other, methane can decrease the reductive products of NO thus moderate the levels of nitrosative stress.

In conclusion, we showed that the myoelectric activity of the small and large intestines changes partly reversibly during ischemia. The nitrergic myenteric neurons follow different adaptational strategies during ischemia and I/R in each intestinal segment, which can be due to the different oxidative and nitrosative stress levels. We proved that methane inhalation applied at the end of ischemic and at the beginning of reperfusion period prevented not only the mucosa but the smooth muscles of the gut wall and the enteric neurons from the harmful effects of hypoxia and reoxygenation by decreasing the levels of oxidative and nitrosative stress markers.

7. FELHASZNÁLT IRODALOM

Alvarez WC, Mahoney LJ. (1922) Action currents in stomach and intestine. *Am J Physiol* 58: 476-493.

Anuras S, Chien SM, Christensen J. (1980) Metabolic dependence of the electromyogram of the cat colon. *Am J Physiol*. 239(3): G173-176.

Araki K, Furuya Y, Kobayashi M, Matsuura K, Ogata T, Isozaki H. (1996) Comparison of mucosal microvasculature between the proximal and distal human colon. *J Electron Microsc.* 45(3): 202–206.

Auerbach L. (1864) Fernere vorläufige Mitteilung über den Nervenapparat des Darmes. *Arch Patol Anat Physiol*. 30: 457-460.

Ballabeni V, Barocelli E, Bertoni S, Impicciatore M. (2002) Alterations of intestinal motor responsiveness in a model of mild mesenteric ischemia/reperfusion in rats. *Life Sci*. 71(17): 2025-2035.

Bass P, Code CF, Lambert EH. (1961) Motor and electric activity of the duodenum. *Am J Physiol*. 201: 287-291.

Beckman JS, Parks DA, Pearson JD, Marshall PA, Freeman BA. (1989) A sensitive fluorometric assay for measuring xanthine dehydrogenase and oxidase in tissues. *Free Rad Biol Med*. 6(6): 607-615.

Beuk RJ, Tangelder GJ, Maassen RL, Quaedackers JS, Heineman E, Oude Egbrink MG. (2008) Leucocyte and platelet adhesion in different layers of the small bowel during experimental total warm ischaemia and reperfusion. *Br J Surg*. 95: 1294–1304. doi: 10.1002/bjs.6320.

Bhattacharyya A, Chattopadhyay R, Mitra S, Crowe SE. (2014) Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. *Physiol Rev*. 94(2): 329-354. doi: 10.1152/physrev.00040.2012.

Bielefeldt K, Conklin JL. (1997) Intestinal motility during hypoxia and reoxygenation in vitro. *Dig Dis Sci*. 42(5): 878-884.

Blikslager AT, Roberts MC, Rhoads JM, Argenzio RA. (1997) Is reperfusion injury an important cause of mucosal damage after porcine intestinal ischemia? *Surgery*. 121(5): 526-534.

Bódi N, Jancsó Zs, Talapka P, Pál A, Poles MZ, Bagyánszki M, Hermes E, Fekete É. (2014) Gut region-specific rearrangement of the cellular and subcellular compartments of nitric oxide synthase isoforms after chronic ethanol consumption in rats. *Histol Histopathol*. 29(12): 1547-1555.

Boehning D, Snyder SH. (2003) Novel neural modulators. *Annu Rev Neurosci*. 26: 105-131.

Bond JH, Engel RR, Levitt MD. (1971) Factors influencing pulmonary methane excretion in man. *J. Exp. Med*. 133(3): 572-588.

Boros M, Ghyczy M, Érces D, Varga G, Tőkés T, Kupai K, Torday C, Kaszaki J. (2012) The anti-inflammatory effects of methane. *Crit Care Med*. 40(4): 1269-1278. doi: 10.1097/CCM.0b013e31823dae05.

Boros M, Tuboly E, Mészáros A, Amann A. (2015) The role of methane in mammalian physiology – is it a gasotransmitter? *J Breath Res.* 9(1): 014001. doi: 10.1088/1752-7155/9/1/014001.

Bouritijs H, van Hoorn DC, Oosting A, van Middelaar-Voskuilen MC, van Limpt CJ, Lamb KJ, van Leeuwen PA, Vriesema AJ, van Norren K. (2008) Carbohydrate supplementation before operation retains intestinal barrier function and lowers bacterial translocation in a rat model of major abdominal surgery. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 32(3): 247-253. doi: 10.1177/0148607108316191.

Bredt DS, Glatt CE, Hwang PM, Fotuhi M, Dawson TM, Snyder SH. (1991) Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase. *Neuron.* 7(4): 615-624.

Bulkley GB, Kvietys PR, Parks DA, Perry MA, Granger DN. (1985b) Relationship of blood flow and oxygen consumption to ischemic injury in the canine small intestine. *Gastroenterology.* 89(4): 852-857.

Bulkley GB, Womack WA, Downey JM, Kvietys PR, Granger DN. (1985a) Characterization of segmental collateral blood flow in the small intestine. *Am J Physiol.* 249(2 Pt 1): G228–235.

Bush TG. (2002) Enteric glial cells. An upstream target for induction of necrotizing enterocolitis and Crohn's disease? *Bioessays.* 24(2): 130-140.

Calcina F, Barocelli E, Bertoni S, Furukawa O, Kaunitz J, Impicciatore M, Sternini C. (2005) Effect of N-methyl-d-aspartate receptor blockade on neuronal plasticity and gastrointestinal transit delay induced by ischemia/reperfusion in rats. *Neurosci.* 134(1): 39-49.

Calvert JW, Jha S, Gundewar S, Elrod JW, Ramachandran A, Pattillo CB, Kevil CG, Lefer DJ. (2009) Hydrogen sulfide mediates cardioprotection through Nrf2 signaling. *Circ Res.* 105(4): 365-374. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.199919. Epub 2009 Jul 16.

Cantu-Medellin N, Kelley EE. (2013a) Xanthine oxidoreductase-catalyzed reactive species generation: A process in critical need of reevaluation. *Redox Biol.* 1: 353-358. doi: 10.1016/j.redox.2013.05.002.

Cantu-Medellin N, Kelley EE. (2013b) Xanthine oxidoreductase-catalyzed reduction of nitrite to nitric oxide: insights regarding where, when and how. *Nitric Oxide.* 34: 19-26. doi: 10.1016/j.niox.2013.02.081. Epub 2013 Feb 27.

Cassuto J, Cedgård S, Haglund U, Redfors S, Lundgren O. (1979) Intramural blood flows and flow distribution in the feline small intestine during arterial hypotension. *Acta Physiol Scand.* 106(3): 335-342.

Cellek S, Anderson PN, Foxwell NA. (2005) Nitrergic neurodegeneration in cerebral arteries of streptozotocin-induced diabetic rats: a new insight into diabetic stroke. *Diabetes.* 54(1): 212-219.

Cellek S, Foxwell NA, Moncada S. (2003) Two phases of nitrergic neuropathy in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes.* 52(9): 2353-2362.

Chen J, McCallum RW. (1994) Electrogastrographic parameters and their clinical significance. In *Electrogastrography: principles and applications.* (eds: Chen J, McCallum RW) Raven Press, New York 45-73.

Chiu CJ, McArdle AH, Brown R, Scott HJ, Gurd FN. (1970) Intestinal mucosal lesion in low-flow states. I. A morphological, hemodynamic, and metabolic reappraisal. *Arch Surg.* 101(4): 478-483.

Chou CC, Gallavan RH. (1982) Blood flow and intestinal motility. *Fed Proc.* 41(6): 2090-2095.

Chou CC, Grassmick B. (1978) Motility and blood flow distribution within the wall of the gastrointestinal tract. *Am J Physiol.* 235(1): H34-39.

Chou CC. (1982) Relationship between intestinal blood flow and motility. *Annu Rev Physiol.* 44: 29-42.

Couturier P, Rose C, Couturier-Turfin NH, Debrav C. (1969) Electromyography of the colon in situ. An experimental study in man and in the rabbit. *Gastroenterology.* 56(2): 317-322.

Dong Z, Saikumar P, Weinberg JM, Venkatachalam MA. (2006) Calcium in cell injury and death. *Annu Rev Pathol.* 1: 405-434.

Dweik RA. (2005) Nitric oxide, hypoxia, and superoxide: the good, the bad, and the ugly! *Thorax.* 60(4): 265-267.

Ehrlein HJ, Schemann M. (2004) The moving gut: Gastrointestinal Motility. egyetemi jegyzet, <http://humanbiology.wzw.tum.de/fileadmin/Bilder/tutorials/tutorial.pdf>

Eiserich JP, Baldus S, Brennan M-L, Ma W, Zhang C, Tousson A, Castro L, Lusc AJ, Nauseef WM, White CR, Freeman BA. (2002) Myeloperoxidase, a leukocyte-derived vascular NO oxidase. *Science.* 296(5577): 2391-2394.

Elrod JW, Calvert JW, Morrison J, Doeller JE, Kraus DW, Tao L, Jiao X, Scalia R, Kiss L, Szabo C, Kimura H, Chow CW, Lefer DJ. (2007) Hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by preservation of mitochondrial function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(39): 15560-15565. Epub 2007 Sep 18.

Ettwig KF, Butler MK, Le Paslier D, Pelletier E, Mangenot S, Kuypers MM, Schreiber F, Dutilh BE, Zedelius J, de Beer D, Gloerich J, Wessels HJ, van Alen T, Luesken F, Wu ML, van de Pas-Schoonen KT, Op den Camp HJ, Janssen-Megens EM, Francoijs KJ, Stunnenberg H, Weissenbach J, Jetten MS, Strous M. (2010) Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria. *Nature.* 464(7288): 543-548. doi: 10.1038/nature08883.

Feinman R, Deitch EA, Watkins AC, Abungu B, Colorado I, Kannan KB, Sheth SU, Caputo FJ, Lu Q, Ramanathan M, Attan S, Badami CD, Doucet D, Barros D, Bosch-Marce M, Semenza GL, Xu D-Z. (2010) HIF-1 mediates pathogenic inflammatory responses to intestinal ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 299(4): G833-843. doi: 10.1152/ajpgi.00065.2010. Epub 2010 Aug 5.

Finkel T. (2003) Oxidant signals and oxidative stress. *Curr Opin Cell Biol.* 15(2): 247-254.

Frasher WG, Wayland H. (1972) A repeating modular organization of the microcirculation of cat mesentery. *Microvasc Res.* 4(1): 62-76.

Fujise T, Iwakiri R, Wu B, Amemori S, Kakimoto T, Yokoyama F, Sakata Y, Tsunada S, Fujimoto K. (2006) Apoptotic pathway in the rat small intestinal mucosa is different between fasting and ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 291(1): G110-116. Epub 2006 Mar 30.

Fukuyama K, Iwakiri R, Noda T, Kojima M, Utsumi H, Tsunada S, Sakata H, Ootani A, Fujimoto K. (2001) Apoptosis induced by ischemia-reperfusion and fasting in gastric mucosa compared to small intestinal mucosa in rats. *Dig Dis Sci.* 46(3): 545-549.

Furness JB. (2000) Types of neurons in the enteric nervous system. *J Auton Nerv Syst.* 81(1-3): 87-96.

Gallavan RH, Chou CC, Kvietys PR, Sit SP. (1980) Regional blood flow during digestion in the conscious dog. *Am J Physiol.* 238(2): H220-225.

Gauthier TW, Davenpeck KL, Lefer AM. (1994) Nitric oxide attenuates leukocyte-endothelial interaction via P-selectin in splanchnic ischemia-reperfusion. *Am J Physiol.* 267(4 Pt 1): G562-568.

Ghyczy M, Torday Cs, Kaszaki J, Szabó A, Czóbel M, Boros M. (2008) Hypoxia-induced generation of methane in mitochondria and eukaryotic cells - an alternative approach to methanogenesis. *Cell Physiol Biochem.* 21: 251-258.

Granger HJ, Nyhof RA. (1982) Dynamics of intestinal oxygenation: interactions between oxygen supply and uptake. *Am J Physiol.* 243(2): G91-96.

Greene EC. (1955) Anatomy of the rat. New York, Hafner Pub. Co.

Grisham MB, Jourdain D, Wink DA. (1999) Nitric oxide. I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation. *Am J Physiol.* 276(2 Pt 1): G315-321.

Grossie VB, Weisbrodt NW, Moore FA, Moody F. (2001) Ischemia/reperfusion-induced disruption of rat small intestine transit is reversed by total enteral nutrition. *Nutrition.* 17(11-12): 939-943.

Haglund U, Bulkley GB, Granger DN. (1987) On the pathophysiology of intestinal ischemic injury. Clinical review. *Acta Chir Scand.* 153(5-6): 321-324.

Harris CM, Massey V. (1997) The reaction of reduced xanthine dehydrogenase with molecular oxygen. Reaction kinetics and measurement of superoxide radical. *J Biol Chem.* 272(13): 8370-8379.

Harrison R. (2002) Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? *Free Radic Biol Med.* 33(6): 774-797.

Hebra A, Brown MF, McGeehin K, Broussard D, Ross AJ 3rd. (1993) The effects of ischemia and reperfusion on intestinal motility. *J Pediatric Surg.* 28(3): 362-365; discussion 365-6.

Hem A. (2010) The biology of laboratory animals. In *Laboratory Animal Science* (eds: Hem A, Eide DM, Engh E, Smith A) The Norwegian Reference Centre for Laboratory Animal Science. Appendix III.: 183.

Hierholzer C, Kalff JC, Audolfsson G, Billiar TR, Tweardy DJ, Bauer AJ. (1999) Molecular and functional contractile sequelae of rat intestinal ischemia/reperfusion injury. *Transplantation.* 68(9): 1244-1254.

Itoh M, Guth PH. (1985) Role of oxygen-derived free radicals in hemorrhagic shock-induced gastric lesions in the rat. *Gastroenterology.* 88(5 Pt 1): 1162-1167.

Izbéki F, Wittman T, Rosztóczy A, Linke N, Bódi N, Fekete E, Bagyánszki M. (2008) Immediate insulin treatment prevents gut motility alterations and loss of nitrergic neurons in

the ileum and colon of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Diabetes Res Clin Pract.* 80(2): 192-198. doi: 10.1016/j.diabres.2007.12.013. Epub 2008 Feb 1.

Jahng J, Jung IS, Choi EJ, Conklin JL, Park H. (2012) The effects of methane and hydrogen gases produced by enteric bacteria on ileal motility and colonic transit time. *Neurogastroenterol Motil.* 24(2): 185-190; e92. doi: 10.1111/j.1365-2982.2011.01819.x. Epub 2011 Nov 20.

Jodal M, Lundgren O. (1986) Countercurrent mechanisms in the mammalian gastrointestinal tract. *Gastroenterology.* 91(1): 225-241.

Kajimura M, Fukuda R, Bateman RM, Yamamoto T, Suematsu M. (2010) Interactions of multiple gas-transducing systems: hallmarks and uncertainties of CO, NO, and H₂S gas biology. *Antioxid Redox Signal.* 13(2): 157-192. doi: 10.1089/ars.2009.2657.

Kasperek MS, Linden DR, Kreis ME, Sarr MG. (2008) Gasotransmitters in the gastrointestinal tract. *Surgery.* 143(4): 455-459. doi: 10.1016/j.surg.2007.10.017. Epub 2008 Jan 30.

Kaszaki J, Mészáros A, Büki T, Varga G, Érces D, Boros M. (2013) A vékonybél-ischaemia és reperfúzió kórtana - új terápiás lehetőségek. *Magy Belorv Arch.* 66: 6-12.

Kelley EE, Khoo NK, Hundley NJ, Malik UZ, Freeman BA, Tarpey MM. (2010) Hydrogen peroxide is the major oxidant product of xanthine oxidase. *Free Radic Biol Med.* 48(4): 493-498. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.11.012. Epub 2009 Nov 24.

Klemm K, Moody FG. (1998) Regional intestinal blood flow and nitric oxide synthase inhibition during sepsis in the rat. *Ann Surg.* 227(1): 126-133.

Krecsmarik M, Izbéki F, Bagyánszki M, Linke N, Bódi N, Kaszaki J, Katarova Z, Szabó A, Fekete E, Wittmann T. (2006) Chronic ethanol exposure impairs neuronal nitric oxide synthase in the rat intestine. *Alcohol Clin Exp Res.* 30(6): 967-973.

Kuebler WM, Abels C, Schuerer L, Goetz AE. (1996) Measurement of neutrophil content in brain and lung tissue by a modified myeloperoxidase assay. *Int. J. Microcirc Clin Exp.* 16(2): 89-97.

Kuwabara Y, Nishino T, Okamoto K, Matsumura T, Eger BT, Pai EF, Nishino T. (2003) Unique amino acids cluster for switching from the dehydrogenase to oxidase form of xanthine oxidoreductase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(14): 8170-8175. Epub 2003 Jun 19.

Kvietys PR, Wilborn WH, Granger DN. (1981) Effects of net transmucosal volume flux on lymph flow in the canine colon. Structural–functional relationship. *Gastroenterology.* 81(6): 1080-1090.

Kvietys PR. (2010) The Gastrointestinal Circulation. (eds: Kvietys PR) Morgan & Claypool Life Sciences, San Rafael.

Lanciault G, Jacobson ED. (1976) The gastrointestinal circulation. *Gastroenterology.* 71(5): 851-873.

Lefer AM, Lefer DJ. (1996) The role of nitric oxide and cell adhesion molecules on the microcirculation in ischaemia-reperfusion. *Cardiovasc Res.* 32(4): 743-751.

Leung FW, Su KC, Passaro E Jr, Guth PH. (1992) Regional differences in gut blood flow and mucosal damage in response to ischemia and reperfusion. *Am J Physiol.* 263(3 Pt 1): G301-305.

Levitt DG, Bond JH, Levitt MD. (1980) Use of a model of small bowel mucosa to predict passive absorption. *Am J Physiol.* 239(1): G23-29.

Lindeström LM, Ekbald E. (2004) Structural and neuronal changes in rat ileum after ischemia with reperfusion. *Dig Dis Sci.* 49(7-8): 1212-1222.

Liu KX, Li YS, Huang WQ, Chen SQ, Wang ZX, Liu JX, Xia Z. (2009) Immediate postconditioning during reperfusion attenuates intestinal injury. *Intensive Care Med.* 35(5): 933-942. doi: 10.1007/s00134-009-1428-1. Epub 2009 Feb 4.

Liu W, Wang D, Tao H, Sun XJ. (2012) Is methane a new therapeutic gas? *Med Gas Res.* 2(1): 25. doi: 10.1186/2045-9912-2-25.

Lomax AE, Linden DR, Mawe GM, Sharkey KA. (2006) Effects of gastrointestinal inflammation on enteroendocrine cells and enteric neural reflex circuits. *Auton Neurosci.* 126-127: 250-257. Epub 2006 Apr 17.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193(1): 265-275.

Lundberg JO, Weitzberg E, Gladwin MT. (2008) The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* 7(2): 156-167. doi: 10.1038/nrd2466.

Lundberg JO, Weitzberg E. (2013) Biology of nitrogen oxides in the gastrointestinal tract. *Gut.* 62(4): 616-629. doi: 10.1136/gutjnl-2011-301649. Epub 2012 Jan 20.

Maejima Y, Adachi S, Morikawa K, Ito H, Isobe M. (2005) Nitric oxide inhibits myocardial apoptosis by preventing caspase-3 activity via S-nitrosylation. *J Mol Cell Cardiol.* 38(1): 163-174. Epub 2004 Dec 8.

Marletta MA. (1994) Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell.* 78(6): 927-930.

Meissner G. (1857) Über die Nerven der Darmwand. *Z Ration Med N F.* 8: 364-366.

Millar TM, Stevens CR, Benjamin N, Eisenthal R, Harrison R, Blake DR. (1998) Xanthine oxidoreductase catalyses the reduction of nitrates and nitrite to nitric oxide under hypoxic conditions. *FEBS Lett.* 427(2): 225-228.

Mizuta Y, Takahashi T, Owyang C. (1999). Nitrergic regulation of colonic transit in rats. *Am J Physiol.* 277 (2 Pt 1): G275-279.

Moody BF, Calvert JW. (2011) Emergent role of gasotransmitters in ischemia-reperfusion injury. *Med Gas Res.* 1(1): 3. doi: 10.1186/2045-9912-1-3.

Moshage H, Kok B, Huizenga JR, Jansen PL. (1995) Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation. *Clin Chem.* 41 (6 Pt 1): 892-896.

Park PO, Haglund U. (1992) Regeneration of small bowel mucosa after intestinal ischemia. *Crit Care Med.* 20(1): 135-139.

Parks DA, Bulkley GB, Granger DN. (1983) Role of oxygen-derived free radicals in digestive tract diseases. *Surgery.* 94(3): 415-422.

Parks DA, Granger DN. (1986) Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. *Am J Physiol.* 250 (6 Pt 1): G749-753.

Perry MA, Wadhwa S, Parks DA, Pickard W, Granger DN. (1986) Role of oxygen radicals in ischemia-induced lesions in the cat stomach. *Gastroenterology.* 90(2): 362-367.

Pimentel M, Lin HC, Enayati P, van den Burg B, Lee HR, Chen JH, Park S, Kong Y, Conklin J. (2006) Methane, a gas produced by enteric bacteria, slows intestinal transit and augments small intestinal contractile activity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 290(6): G1089-1095. Epub 2005 Nov 17.

Premen AJ, Banchs V, Womack WA, Kviety PR, Granger DN. (1987) Importance of collateral circulation in the vascularly occluded feline intestine. *Gastroenterology*. 92(5 Pt 1): 1215-1219.

Rivera LR, Pontell L, Cho HJ, Castelucci P, Thacker M, Poole DP, Frugier T, Furness JB. (2012) Knock out of neuronal nitric oxide synthase exacerbates intestinal ischemia/reperfusion injury in mice. *Cell Tissue Res*. 349(2): 565-576. doi: 10.1007/s00441-012-1451-3. Epub 2012 Jun 12.

Rivera LR, Thacker M, Castelucci P, Bron R, Furness JB. (2009) The reactions of specific neuron types to intestinal ischemia in the guinea pig enteric nervous system. *Acta Neuropathol*. 118(2): 261-270. doi: 10.1007/s00401-009-0549-5. Epub 2009 May 23.

Rivera LR, Thacker M, Pontell L, Cho HJ, Furness JB. (2011) Deleterious effects of intestinal ischemia/reperfusion injury in the mouse enteric nervous system are associated with protein nitrosylation. *Cell Tissue Res*. 344(1): 111-123. doi: 10.1007/s00441-010-1126-x. Epub 2011 Feb 9.

Román V, Bagyánszki M, Krecsmarik M, Horváth A, Resch BA, Fekete É. (2004) Spatial pattern analysis of nitrergic neurons in the developing myenteric plexus of the human fetal intestine. *Cytometry A*. 57(2): 108-112.

Rubbo H, Radi R, Trujillo M, Telleri R, Kalyanaraman B, Barnes S, Kirk M, Freeman BA. (1994) Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *J Biol Chem*. 269(42): 26066-26075.

Sessa WC, Barber CM, Lynch KR. (1993) Mutation of N-myristoylation site converts endothelial cell nitric oxide synthase from a membrane to a cytosolic protein. *Circ Res*. 72(4): 921-924.

Silva MA, de Meirelles LR, Bustorff-Silva JM. (2007) Changes in intestinal motility and in the myenteric plexus in a rat model of intestinal ischemia–reperfusion. *J Pediatr Surg*. 42(6): 1062–1065.

Smith RA, Murphy MP. (2011) Mitochondria-targeted antioxidants as therapies. *Discov Med*. 11(57): 106-114.

Song K, Zhang M, Hu J, Liu Y, Liu Y, Wang Y, Ma X. (2015) Methane-rich saline attenuates ischemia/reperfusion injury of abdominal skin flaps in rats via regulating apoptosis level. *BMC Surgery* 15: 92-100.

Sun D, Messina EJ, Kaley G, Koller A. (1992) Characteristics and origin of myogenic response in isolated mesenteric arterioles. *Am J Physiol*. 263(5 Pt 2): H1486–1491.

Takahashi A, Tomomasa T, Kaneko H, Watanabe T, Tabata M, Morikawa H, Tsuchida Y, Kuwano H. (2001) Intestinal motility in an in vivo rat model of intestinal ischemia-reperfusion with special reference to the effects of nitric oxide on the motility changes. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 33(3): 283-288.

Takeyoshi I, Zhang S, Nakamura K, Ikoma A, Zhu Y, Starzl TE, Todo S. (1996) Effect of ischemia on the canine large bowel: a comparison with the small intestine. *J Surg Res*. 62(1): 41-48.

Talapka P, Bódi N, Battonyai I, Fekete E, Bagyánszki M. (2011) Subcellular distribution of nitric oxide synthase isoforms in the rat duodenum. *World J Gastroenterol*. 17(8): 1026-1029. doi: 10.3748/wjg.v17.i8.1026.

Tank PW, Gest TR. (2008) Atlas of anatomy. Lippincott Williams & Wilkins

Toyokuni S. (1999) Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology. *Pathol Int*. 49(2): 91-102.

Törnblom H, Abrahamsson H, Barbara G, Hellström PM, Lindberg G, Nyhlin H, Ohlsson B, Simrén M, Sjölund K, Sjövall H, Schmidt PT, Ohman L. (2005) Inflammation as a cause of functional bowel disorders. *Scand J Gastroenterol*. 40(10): 1140-1148.

Udassin R, Eimerl D, Schiffman J, Haskell Y. (1995) Postischemic intestinal motility in rat is inversely correlated to length of ischemia. An in vivo animal model. *Dig Dis Sci*. 40(5): 1035-1038.

Van Geldre LA, Fraeyman NH, Peeters TL, Timmermans JP, and Lefebvre RA. (2004) Further characterization of particulate neuronal nitric oxide synthase in rat small intestine. *Auton Neurosci*. 110(1): 8-18. doi:10.1016/j.autneu.2003.05.001.

Vannucchi MG, Corsani L, Bani D, Faussone-Pellegrini MS. (2002) Myenteric neurons and interstitial cells of Cajal of mouse colon express several nitric oxide synthase isoforms. *Neurosci Lett*. 326(3): 191-195.

Varga G, Érces D, Tuboly E, Kaszaki J, Ghyczy M, Boros M. (2012) Metánbelélegzés gyulladáscsökkentő hatásának vizsgálata ischaemia-reperfusio alatt. *Magyar Sebészet*. 65(4): 205-211.

Ventura-Martinez R, Santiago-Mejia J, Gomez C, Rodriguez R, Fortoul TI. (2007) Acute morphological changes in guinea pig ileum myenteric neurons after ischemia in situ with superfusion in vitro. *Pathol Res Pract*. 204(2): 121–127. Epub 2007 Dec 21.

Vollmar B, Menger MD. (2011) Intestinal ischemia/reperfusion: microcirculatory pathology and functional consequences. *Langenbecks Arch Surg*. 396(1): 13-29. doi: 10.1007/s00423-010-0727-x. Epub 2010 Nov 19.

Walus KM, Jacobson ED. (1981) Relation between small intestinal motility and circulation. *Am J Physiol*. 241(1): G1-15.

Weitzberg E, Hezel M, Lundberg JO. (2010) Nitrate-nitrite-nitric oxide pathway: implications for anesthesiology and intensive care. *Anesthesiology*. 113(6): 1460-1475. doi: 10.1097/ALN.0b013e3181f3cf3cc.

Wink DA, Mitchell JB. (1998) Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic Biol Med*. 25(4-5): 434-456.

Yasuhara H. (2005) Acute mesenteric ischemia: the challenge of gastroenterology. *Surg Today*. 35(3): 185–195.

Ye Z, Chen O, Zhang R, Nakao R, Fan D, Zhang T, Gu Z, Tao H, Sun X. (2015) Methane attenuates hepatic ischemia/reperfusion injury in rats through antiapoptotic, anti-inflammatory, and antioxidative actions. *Shock* 44: 181-187.

Zhao W, Zhang J, Lu Y, Wang R. (2001) The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener. *EMBO J*. 20(21): 6008-6016.

8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm témavezetőimnek, Dr. Fekete Éva professzor emeritának és Dr. Bódi Nikolett egyetemi adjunktusnak, hogy útmutatásaikkal és figyelmükkel szakmailag és emberileg is támogattak, és mindvégig segítettek munkámban.

Köszönöm Dr. Kaszaki József egyetemi docensnek, a kísérleteim kivitelezésénél nyújtott rengeteg segítségét, hogy szakmai jellegű kérdéseim és problémáim megoldásában mindig nagy odaadással segített.

Köszönöm Sótiné Dr. Bagyánszki Mária egyetemi docensnek, Dr. Talapka Petra és Dr. Szalai Zita egyetemi tanársegédeknek, hogy szakmai jellegű kérdéseimmel bármikor fordulhattam hozzájuk.

Köszönöm Dr. Toldi József professzor úrnak, valamint Dr. Varga Csaba docensnek, az Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék tanszékvezetőinek, hogy tanszékükön készíthettem el doktori értekezésemet.

Köszönöm Dr. Boros Mihály professzor úrnak, a Szegedi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Sebészeti Műtéttani Intézet tanszékvezető egyetemi tanárának, hogy lehetővé tette a kutatócsoportjaink közötti együttműködést, hogy a munkánkhoz szükséges állatkísérletek egy részét az ő intézetükben végezzem el.

Külön köszönet a Szegedi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Sebészeti Műtéttani Intézet munkatársainak, akik segítettek az állatok kezelésének és a náluk alkalmazott laboratóriumi technikáknak az elsajátításában. Köszönöm továbbá a laboránsoknak, hogy kísérleteim közben mindig lelkesen a segítségemre siettek, mikor szükség volt rá.

Köszönöm az Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék és a Sebészeti Műtéttani Intézet mindazon dolgozóinak, akik valamilyen úton-módon hozzájárultak az értekezés elkészítéséhez.

Végül, de nem utolsósorban, köszönöm szüleimnek, barátomnak és hozzátartozóimnak a munkám elkészítése alatt nyújtott türelmet és támogatást.

9. KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA

Folyóiratban megjelent teljes közlemények:

1. N. Bódi, P. Talapka, **M. Poles**, E. Hermes, Zs. Jancsó, Z. Katarova, F. Izbéki, T. Wittmann, É. Fekete, M. Bagyánszki (2012) Gut region-specific diabetic damage to the capillary endothelium adjacent to the myenteric plexus. *Microcirculation* 19(4): 316-326. **IF: 2.763**
2. *Z. Máté, ***M.Z. Poles**, G. Szabó, M. Bagyánszki, P. Talapka, É. Fekete, N. Bódi (2013) Spatiotemporal expression pattern of REDT3/CCK gene construct during postnatal development of myenteric plexus in transgenic mice. *Cell and Tissue Research* 352(2): 199-206. **IF: 3.333**
*- megosztott első szerző
3. N. Bódi, Zs. Jancsó, P. Talapka, A. Pál, **M. Z. Poles**, M. Bagyánszki, E. Hermes, É. Fekete (2014) Gut region-specific rearrangement of the cellular and subcellular compartments of nitric oxide synthase isoforms after chronic ethanol consumption in rats. *Histol Histopathol.* 29(12):1547-1555. **IF: 2.096**
4. P. Talapka, L. Nagy, A. Pál, **M. Poles**, A. Berkó, M. Bagyánszki, L. G. Puskás, É. Fekete, N. Bódi (2014) Alleviated mucosal and neuronal damage in a rat model of Crohn's disease. *World J Gastroenterol.* 20(44):16690-16697. **IF: 2.369**

Összesített impakt faktor: 10.561

Független idézők száma: 8

MTMT azonosító: 10026448

Nyomtatásban megjelent előadás kivonatok:

Idegen nyelven tartott konferencia előadás:

N. Bódi, P. Talapka, **M. Poles**, M. Bagyánszki, A.I. Rosztóczy, É. Fekete, F. Izbéki, T. Wittmann (2011) Diabetes-related structural, molecular and functional alterations in capillaries supplying to the myenteric plexus can be responsible for the region-specific nitrergic neuropathy in the gut of streptozotocin-induced diabetic rats. 19th United European Gastroenterology Week, Stockholm, Sweden, 2011 október 22-26.; Gut 60 (Suppl 3) A313 IF: 10,614

M. Z. Poles, A. Mészáros, N. Bódi, M. Bagyánszki, G. Varga, É. Fekete, J. Kaszaki, M. Boros (2014) Effect of methane on gastrointestinal motility in ischemia-reperfusion. 49th Congress of the European Society for Surgical Research, Budapest, Hungary, 2014. május 21-24.; Magyar Sebészet 67(3):235-236.

M. Z. Poles, N. Bódi, P. Talapka, G. Varga, A. Pál, M. Bagyánszki, R. Gáspár, J. Kaszaki, É. Fekete, M. Boros (2014) Effects of methane inhalation on the nitrergic myenteric neurons and intestinal myoelectrical activity during mesenteric ischemia-reperfusion in rats. Joint Meeting of the Federation of European Physiological Societies (FEPS) and the Hungarian Physiological Society, Budapest, Hungary, 2014. augusztus 27-30.; Acta Physiologica (ISSN: 1748-1708) 211: (S697) p. 11.

Magyar nyelven tartott konferencia előadás:

M. Poles, N. Bódi, P. Talapka, G. Szabó, Z. Katarova, É. Fekete, M. Bagyánszki (2010) Cholecystokinin tartalmú entericus neuronok morfológiai és neurokémiai jellemzése korai posztnatális és felnőtt transzgenikus egerekben. Tudományos Diákköri Konferencia, Szeged, Magyarország, 2010. november. 18.

M. Poles, N. Bódi, P. Talapka, G. Szabó, Z. Katarova, É. Fekete, M. Bagyánszki (2011) Cholecystokinin tartalmú entericus neuronok morfológiai és neurokémiai jellemzése korai posztnatális és felnőtt transzgenikus egerekben. XXX. Jubileumi Országos Tudományos Diákköri Konferencia, Budapest, Magyarország, 2011. április. 19-21.

P. Talapka, L. Nagy, A. Pál, **M. Poles**, G.L. Puskás, M. Bagyánszki, É. Fekete, N. Bódi (2013) Strukturális és molekuláris változások Crohn-beteg patkányok bélidegrendszerében. XIV. Kolozsvári Biológus Napok, Kolozsvár, Románia, 2013. április 12-14.

P. Talapka, L. Nagy, A. Pál, L.G. Puskás, **M. Poles**, M. Bagyánszki, É. Fekete, N. Bódi (2013) Strukturális és molekuláris változások Crohn-beteg patkányok bélidegrendszerében. Tavaszi Szél, Sopron, Magyarország, 2013. május 31. – június 2.

M. Poles, N. Bódi, P. Talapka, G. Varga, T. Tőkés, A. Pál, M. Bagyánszki, J. Kaszaki, É. Fekete, M. Boros (2013) Exogén metán hatása a myentericus nitrerg neuronok denzitására mesenterális ischaemia-reperfúzió alatt. A Magyar Élettani, Farmakológiai és Mikrocirkulációs Társaságok 2013. évi közös Tudományos Kongresszusa, Budapest, Magyarország, 2013. június 5-8.

M. Z. Poles, P. Talapka, G. Varga, A. Pál, M. Bagyánszki, J. Kaszaki, É. Fekete, M. Boros, N. Bódi (2014) Exogén metán hatása a myentericus nitrerg neuronok kvantitatív sajátosságaira és a bélcsatorna motilitására mesenterális ischaemia-reperfúzió alatt kísérletes patkánymodellen. 17. Tavaszi Szél Konferencia, Debrecen, Magyarország, 2014. március 21-23.

M. Z. Poles, N. Bódi, P. Talapka, G. Varga, A. Pál, M. Bagyánszki, J. Kaszaki, É. Fekete, M. Boros, N. Bódi (2014) Effects of Methane Inhalation on the Nitrergic Myenteric Neurons and Intestinal Motility During Mesenteric Ischemia-reperfusion in Rats. 1st Innovation in Science 2014 – Doctoral Student Conference, Szeged, Magyarország, 2014. május 2-3.

Poszter nemzetközi konferencián:

P. Talapka, L. Nagy, **M. Poles**, L.G. Puskás, É. Fekete, M. Bagyánszki, N. Bódi (2012) Quantitative Changes in the Density of Myenteric Neurons and in Expression of Inflammatory Markers in a Rat Model of Crohn's Disease. IBRO International Workshop, Szeged, Hungary, 2012. január 19-21.

P. Talapka, L. Nagy, **M. Poles**, L.G. Puskás, É. Fekete, N. Bódi (2012) Aligned Alteration of Enteric Neurons, Smooth Muscle Cells and Inflammatory Markers Involved in Stricture Formation in a Rat Model of Crohn's Disease. 8th International Conference of PhD Students, Miskolc, Hungary, 2012. augusztus 6-10.

N. Bódi, P. Talapka, Z. Jancsó, **M. Poles**, E. Hermes, M. Bagyánszki, É. Fekete, F. Izbéki, T. Wittmann (2012) Gut Region-specific Differences in the Cellular and Subcellular Distribution of Nitric Oxide Synthase Isoforms After Chronic Ethanol Exposure in Rats. 20th United European Gastroenterology Week, Amsterdam, Nederland, 2012. október 12-16.; Gut 61 (supl3) A304 IF:10.614

P. Talapka, L. Nagy, **M. Poles**, L.G. Puskás, É. Fekete, M. Bagyánszki, N. Bódi (2012) Aligned Alteration of Enteric Neurons, Smooth Muscle Cells and Inflammatory Markers Involved in Stricture Formation in a Rat Model of Crohn's Disease. 20th United European Gastroenterology Week, Amsterdam, Nederland, 2012. október 12-16.; Gut 61 (supl3) A156 IF:10.614

P. Talapka, L. Nagy, A. Pál, L.G. Puskás, **M. Poles**, M. Bagyánszki, É. Fekete, N. Bódi (2013) Experimentally Provoked Recurrent Inflammation Improves Mucosal Healing and Restoration of Impaired Morphology of Myenteric Neuron in a Rat Model of Crohn's Disease. 21th United European Gastroenterology Week, Berlin, Germany, 2013. október 12-16.; UEG Journal 1(1):p. A205

N. Bódi, P. Talapka, G. Varga, T. Tőkés, **M.Z. Poles**, A. Pál, M. Bagyánszki, J. Kaszaki, É. Fekete, M. Boros (2013) Inhaled Methane is Preventing an Increase in Nitrergic Myenteric Neuron Density and Enhanced Oxidative and Nitrosative Stress After Mesenteric Ischemia-Reperfusion in Rats. 21th United European Gastroenterology Week, Berlin, Germany, 2013. október 12-16.; UEG Journal 1(1):p. A393

N. Bódi, Zs. Jancsó, Zs. Giricz, A. Pál, P. Talapka, **M. Poles**, M. Bagyánszki, E. Hermes, É. Fekete (2014) Changes of lysyl-oxidase expression in myenteric ganglia in different gut segments of streptozotocin-induced untreated and insulin-treated diabetic rats. IBRO Workshop, Debrecen, Hungary, 2014. január 16-17.

P. Talapka, L.I. Nagy, A. Pál, L.G. Puskás, **M. Poles**, M. Bagyánszki, É. Fekete, N. Bódi (2014) Alleviated mucosal and neuronal damage at the acute phase of recurrent inflammation in a rat model of Crohn's disease. IBRO Workshop, Debrecen, Hungary, 2014. január 16-17.

Poszter hazai konferencián:

P. Talapka, N. Bódi, **M. Poles**, M. Bagyánszki, É. Fekete (2011) TNBS-indukált vastagbélgyulladás akut és krónikus hatásainak vizsgálata patkánymodellen. Magyar Gasztroenterológiai Társaság 53. Nagygyűlése, Tihany, Magyarország, 2011. június 4-7.

N. Bódi, Zs. Jancsó, Zs. Giricz, A. Pál, P. Talapka, **M. Poles**, M. Bagyánszki, E. Hermes, É. Fekete (2013) Changes of lysyl-oxidase expression in different gut segments of streptozotocin-induced untreated and insulin-treated diabetic rats. Biomedica Minikonferencia, Szeged, Magyarország, 2013. december 13.